UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Wilson Domingues

Desenvolvimento de uma *multiplex*-PCR baseada na amplificação dos três genes mitocondriais de *Plasmodium* para a detecção e diferenciação das espécies *falciparum*, *vivax* e *malariae*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor

Área de Concentração: Medicina Tropical e Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Thelma Suely Okay

São Paulo
2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Domingues, Wilson

Desenvolvimento de uma multiplex-PCR baseada na amplificação dos três genes mitocondriais de *Plasmodium* para a detecção e diferenciação das espécies *falciparum*, *vivax* e *malariae* / Wilson Domingues. – São Paulo, 2018.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Thelma Suely Okay

Descritores: 1. DIAGNÓSTICO. 2. GENES. 3. MALÁRIA. 4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE. 5. *PLASMODIUM*. 6. DOENÇAS INFECCIOSAS.

USP/IMTSP/BIB-19/2018.

O presente trabalho foi realizado com apoio da
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de
Financiamento 001.

“Sou o que quero ser, porque possuo apenas uma vida e nela só tenho uma chance de fazer o que quero. Tenho felicidade o bastante para fazê-la doce, dificuldades para fazê-la forte, tristeza para fazê-la humana e esperança o suficiente para fazê-la feliz. As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas, elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos”

Clarice Lispector

Dedicatória

À **Deus** por me guiar pelo caminho certo, e ao meu pai
Oxaguiã, por não deixar com que me perdesse nesta
caminhada.

Ao **meu companheiro** Pedro Domingos Leite Junior pela dedicação, amor, carinho e por estar sempre me incentivando e me dando forças para nunca desistir de meus sonhos, apesar de todas as dificuldades encontradas. Dedico à realização deste sonho.

A **minha amada mãe** Elizabeth Godoy Domingues pelo seu amor infinito e por me ensinar que na vida tudo vale a pena, quando se tem amor, respeito e determinação. Apesar de todas as dificuldades encontradas na caminhada da vida. Dedico este grande esforço e realização de um sonho.

Ao **meu irmão** Valdir Domingues e minha **sobrinha** Juliana Gonçalves Domingues por estarem sempre presente em minha vida,

“Creio que a pessoa que teve mais experiência de privações consegue enfrentar os problemas com mais firmeza que a pessoa que nunca passou por sofrimento. Portanto, visto por este ângulo, um pouco de sofrimento pode ser uma boa lição para a vida”

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Dra. Thelma Suely Okay pela dedicação e paciência na elaboração deste trabalho, acreditando em minha capacidade.

À Dra. Kelly Aparecida Kanunfre por me auxiliar no desenvolvimento deste maravilhoso sonho de vida.

Ao Professor. Dr. Marcelo Urbano, Dra. Silvia di Santi por gentilmente cederem amostras positivas de *Plasmodium* para realização deste trabalho.

À Dra. Cristina Santo, Professor. Heitor Franco de Andrade Júnior, Dr. José Ângelo Lauletta Lindoso, Dra Karin Kirchgatter, Dra. Lúcia Maria Almeida Braz, Professor Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho, Professor. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek por gentilmente cederem amostras (DNA) para realização dos testes de especificidade para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Lidia Yamamoto pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À minha querida amiga Edite H. Y. Kanashiro pela gentil colaboração para a finalização dos experimentos deste trabalho.

À minha querida amiga Dra. Sandra do Lago Moraes por ter aberto as portas do IMT-USP, para a realização deste sonho.

À Dra. Fabiana Maria de Souza Leoratti pelos ensinamentos passados no início de minha caminhada científica, e mesmo à distância, sempre tendo uma palavra de carinho e conforto nos momentos de adversidades da vida.

À Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro por nos proporcionar o Laboratório de Micologia do Instituto de Medicina Tropical da USP.

Aos meus amigos de laboratório por me auxiliarem, e por sempre terem uma palavra de conforto nos momentos difíceis, principalmente nos momentos felizes como o atual.

A todos colegas do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia pela boa convivência ao longo destes 11 anos e pelos momentos de descontração.

À minha querida amiga Iara Gonçalves Mazeto pelas orações, à minha irmã Janaina Gonçalves e os meus filhos de fé, pelo incentivo e pelas palavras de carinho nas horas difíceis e por estarem sempre ao meu lado nesta caminhada, ajudando com que este sonho fosse realizado.

À Eliane, secretária da CPG e ao Carlos da biblioteca, por toda paciência, prestatividade e colaboração para a realização desse trabalho.

A todos os funcionários da Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da USP, da limpeza e todos que de certa forma me incentivaram e acreditaram na realização deste grande sonho.

Muito obrigado.

RESUMO

Domingues W. Desenvolvimento de uma *multiplex*-PCR baseada na amplificação dos três genes mitocondriais de *Plasmodium* para a detecção e diferenciação das espécies *falciparum*, *vivax* e *malariae* [tese] São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018.

A malária é a doença infecciosa mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com *primers* do 18S rRNA (4-8 cópias/parasito) no formato *semi-nested* ou *nested*-PCR são empregadas como referência. O genoma mitocondrial dos plasmódios é pequeno (6 kb) contendo três genes que codificam a enzima citocromo c oxidase I (cox I), a citocromo c oxidase III (cox III) e a citocromo b (cyt b), com número de cópias variando de 20-150/parasito. Esta pesquisa desenvolveu uma *multiplex*-PCR baseada na amplificação de cox I, cox III e cyt b para a detecção simultânea de *Plasmodium* das espécies *falciparum*, *vivax* e *malariae*. A utilização de três pares de *primers* espécie-específicos, em uma única etapa de amplificação em lugar de uma *nested*-PCR (18S rRNA) poderia minimizar a ocorrência de contaminações (*carry-over*), reduzindo o custo das reações e o tempo para a liberação de resultados. A seleção dos *primers* empregou a estratégia ASO (Allele Specific Oligonucleotide), os amplificadores das três espécies foram clonados e os plasmídeos contendo os insertos (controles positivos) foram usados em diluições seriadas determinar o limite de detecção que foi de 22,5 cópias para *P. falciparum*, 28,7 cópias para *P. vivax* e 32 cópias para *P. malariae*. Como cada parasito possui entre 20-150 cópias dos genes mitocondriais, a *multiplex*-PCR detectou 1 parasito das três espécies. Na etapa de validação, amostras antigas e recentes provenientes de regiões endêmicas foram testadas, todas com diagnóstico de gênero e espécie de *Plasmodium*. A *multiplex*-PCR foi mais sensível que a microscopia (gota espessa) quando 104 amostras foram testadas, e tão sensível quanto a *semi-nested* (n=60), a *nested*-PCR (n=6) e a PCR em Tempo Real (n=38). No entanto, na análise das espécies de *Plasmodium*, houve discordâncias da *multiplex*-PCR tanto em relação a gota espessa, quanto com a *semi-nested*-PCR principalmente na detecção de infecções mistas, havendo mais espécies detectadas pela *semi-nested*-PCR. Não houve discordâncias com a *nested*-PCR e a PCR em Tempo Real. Testes de especificidade da *multiplex*-PCR utilizando DNA de outros microrganismos e de doadores de banco de sangue não encontraram reações cruzadas (100% de especificidade). O estudo concluiu que a *multiplex*-PCR foi desenvolvida com sucesso, com especificidade de 100%, apresentando sensibilidade superior à gota espessa e equivalente à *semi-nested*-PCR, *nested*-PCR e PCR em Tempo Real, no entanto com discordâncias na identificação de espécies. Estudos prospectivos com amostras apresentando resultados discordantes nos testes moleculares de referência deverão ser testadas para avaliar se a nova ferramenta molecular possui sensibilidade superior.

Descritores. Diagnóstico; Genes; Malária; Reação Em Cadeia da Polimerase; *Plasmodium*; Doenças Infecciosas

ABSTRACT

Domingues W. Development of a *multiplex*-PCR with amplification of the three mitochondrial *Plasmodium* genes for the detection and differentiation of *falciparum*, *vivax* and *malariae* species [tese] São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018.

Malaria is the most prevalent infectious disease in tropical and subtropical regions and the Polymerase Chain Reaction (PCR) based on the 18S rRNA sequence (4-8 copies/parasite) in semi-nested and nested-PCR formats are the reference tests. *Plasmodium* mitochondrial genome is small (6 kb) containing three genes encoding cytochrome c oxidase I (cox I), cytochrome c oxidase III (cox III) and cytochrome b (cyt b), with number of copies varying from 20-150/parasite. This research developed a multiplex-PCR based on the amplification of cox I, cox III and cyt b for the simultaneous detection of *Plasmodium falciparum*, *vivax* and *malariae*. The use of three pairs of species-specific primers in a single amplification step rather than a nested-PCR (18S rRNA) could minimize the occurrence of carry-over, reducing the cost of reactions and the time to release of results. The selection of primers employed the ASO (Allele Specific Oligonucleotide) strategy. Amplification products of the three species were cloned and the plasmids containing the inserts (positive controls) were used in serial dilutions to determine the limit of detection (*LoD*) of 22.5 copies for *P. falciparum*, 28.7 copies for *P. vivax* and 32 copies for *P. malariae*. As each parasite has between 20-150 copies of the mitochondrial genes, the multiplex-PCR was able to detect 1 parasite of the three species. In the validation stage, old and recent samples from endemic regions were tested, all with diagnosis of genus and *Plasmodium* species. The multiplex-PCR was more sensitive than the thick blood smear when 104 samples were tested, and was as sensitive as the semi-nested (n=60), the nested-PCR (n=6) and the Real-Time PCR (n=38). However, in relation to *Plasmodium* species, there were disagreements of the multiplex-PCR with respect to both, the thick blood smear and the semi-nested PCR, mainly in the detection of mixed infections, with more species detected by the semi-nested-PCR. There were no disagreements with the nested-PCR and the Real-Time PCR. Multiplex-PCR specificity tests using DNA from other microorganisms and from blood bank donors found no cross-reactivity (100% specificity). The study concluded that the multiplex-PCR was successfully developed with specificity of 100%, presenting higher sensitivity than the thick blood smear and equivalent sensitivity to the semi-nested-PCR, the nested-PCR and the real-time PCR, however with disagreements in the identification of species. Prospective studies are needed to test the multiplex-PCR on samples with discordant results in reference molecular tests to assess whether the new molecular tool has superior sensitivity.

Descriptors. Diagnosis; Genes; Malaria; Polymerase Chain Reaction; *Plasmodium*; Infectious Diseases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil 2017.	5
Figura 2	Ciclo de vida das espécies de <i>Plasmodium</i> infectantes ao homem.	7
Figura 3	DNA nuclear e extranuclear (apicoplasto e mitocondrial) de <i>Plasmodim vivax</i> .	14
Figura 4	Organização do genoma mitocondrial de <i>Plasmodium</i> de aproximadamente 6 kb. Foram representados os três genes mitocondriais (cox I, cox III e cytb).	15
Figura 5	Organização do genoma mitocondrial localizando os genes que codificam proteínas mitocondriais (cox I, cox III e cytb).	16
Figura 6	Exemplo da disposição de repetições em <i>tandem</i> .	17
Figura 7	Esquema de detecção de alelos específicos por PCR-ASO.	28
Figura 8	Alinhamento do gene mitocondrial cox III das três espécies (<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i>).	29
Figura 9	Alinhamento do gene mitocondrial cox I das três espécies (<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i>).	30
Figura 10	Alinhamento do gene mitocondrial cytb das três espécies (<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i>).	31
Figura 11	Representação em gel (poliacrilamida) dos produtos de amplificação detectados por eletroforese capilar. Observa-se que não houve amplificação para <i>P. chabaudi</i> , <i>P. berghei</i> e <i>P. nucleophilum</i> (marrom, lilás e verde escuro), bem como nos controles negativos da sala de reagentes e de extração (azul escuro e verde claro); observamos amplificação apenas nos três controles positivos da reação <i>P. falciparum</i> (346 bp), <i>P. vivax</i> (311 bp) e <i>P. malariae</i> (226 bp) (vermelho, rosa e verde). MA – marcadores de alinhamento (20 e 1000 bp). C+ controle positivo.	44

- Figura 12 Eletroferogramas gerados das fitas *sense* (A) e *antisense* (B) da 45
amplificação de fragmento do gene *cox III* que amplificam
especificamente *P. falciparum*. A seguir, análise resultante do
programa BLAST (C), onde *query* (seta vermelha) corresponde à
sequência de nucleotídeos no formato FASTA gerados pelo
sequenciamento do protótipo e *subject* (seta preta) correspondendo
à sequência obtida no estudo, que deve ser comparada ao protótipo,
indicando 99% de similaridade (C), e localização das sequências no
gene *cox III* (D).
- Figura 13 Eletroferogramas gerados das fitas *sense* (A) e *antisense* (B) da 46
amplificação de fragmento do gene *cox I* que amplificam
especificamente *P. vivax*. A seguir, análise resultante do programa
BLAST (C), onde *query* (seta vermelha) corresponde à sequência
de nucleotídeos no formato FASTA gerados pelo sequenciamento
do protótipo e *subject* (seta preta) correspondendo à sequência
obtida no estudo, que deve ser comparada ao protótipo, indicando
100% de similaridade (C), e localização das sequências no gene *cox I* (D).
- Figura 14 Eletroferogramas gerados das fitas *sense* (A) e *antisense* (B) da 47
amplificação de fragmento do gene *cytb* que amplificam
especificamente *P. malariae*. A seguir, análise resultante do
programa BLAST (C), onde *query* (seta vermelha) corresponde à
sequência de nucleotídeos no formato FASTA gerados pelo
sequenciamento do protótipo e *subject* (seta preta) correspondendo
à sequência obtida no estudo, que deve ser comparada ao protótipo,
indicando 96% de similaridade (C), e localização das sequências no
gene *cytb* (D).
- Figura 15 Eletroforese capilar: representação em eletroferograma (A) e em 59
gel de poliacrilamida (B) de um caso de infecção mista por *P. vivax*
(325 bp) e *P. falciparum* (356 bp). Setas verdes indicam os
marcadores de alinhamento (20 e 1000 bp).
- Figura 16 Eletroforese capilar: representação em eletroferograma (A) e em 59
gel de poliacrilamida (B) de um caso de infecção mista por *P.*
malariae (235 bp) e *P. vivax* (324 bp). Setas verdes indicam os
marcadores de alinhamento (20 e 1000 bp).

- Figura 17 Eletroferogramas gerados das fitas *sense* (A) e *antisense* (B) da amplificação de fragmento do gene *cox III* de *P. falciparum* de uma amostra de paciente. A seguir, análise resultante do programa BLAST (C), onde *query* (seta vermelha) corresponde à sequência de nucleotídeos no formato FASTA gerados pelo sequenciamento do protótipo e *subject* (seta preta) correspondendo à sequência obtida no estudo, que deve ser comparada ao protótipo, indicando 99% de similaridade (C). Em (D) a localização das sequências no gene *cox III*. 61
- Figura 18 Eletroferogramas gerados das fitas *sense* (A) e *antisense* (B) da amplificação de fragmento do gene *cox I* de *P. vivax* de uma amostra de paciente. A seguir, análise resultante do programa BLAST (C), onde *query* (seta vermelha) corresponde à sequência de nucleotídeos no formato FASTA gerados pelo sequenciamento do protótipo e *subject* (seta preta) correspondendo à sequência obtida no estudo, que deve ser comparada ao protótipo, indicando 99% de similaridade (C). Em (D) a localização das sequências no gene *cox I*. 62
- Figura 19 Eletroferogramas gerados das fitas *sense* (A) e *antisense* (B) da amplificação de fragmento do gene *cytb* de *P. malariae* de uma amostra de paciente. A seguir, análise resultante do programa BLAST (C), onde *query* (seta vermelha) corresponde à sequência de nucleotídeos no formato FASTA gerados pelo sequenciamento do protótipo e *subject* (seta preta) correspondendo à sequência obtida no estudo, que deve ser comparada ao protótipo, indicando 99% de similaridade (C). Em (D) a localização das sequências no gene *cytb*. 63
- Figura 20 Representação em gel (poliacrilamida) dos produtos de amplificação detectados por eletroforese capilar. Observa-se que não houve amplificação nas sete amostras de banco de sangue (BS). Observamos amplificação apenas nos três controles positivos da reação *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (vermelho, roxo e verde). MA – marcadores de alinhamento (20 e 1000 bp). C+ controle positivo. 64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Resumo dos trabalhos publicados que utilizaram como alvo os genes que codificam 18S rRNA, cytb, cox I e cox III para o diagnóstico molecular de malária.	21
Quadro 2	Classificação dos valores obtidos no teste de concordância de Kappa.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Notificação de casos de malária no Brasil no ano de 2016.	3
Tabela 2	Estimativa da parasitemia a partir da avaliação quantitativa (microscopia).	13
Tabela 3	Descrição dos <i>primers</i> usados na <i>multiplex</i> -PCR.	32
Tabela 4	Parâmetros avaliados na padronização das três amplificações da <i>multiplex</i> -PCR.	40
Tabela 5	Parâmetros definidos para a amplificação das três espécies de <i>Plasmodium</i> (em conjunto) na <i>multiplex</i> -PCR.	40
Tabela 6	Condições de amplificação analisadas.	41
Tabela 7	Condições de amplificação da <i>multiplex</i> -PCR.	41
Tabela 8	Comparação dos resultados das espécies de <i>Plasmodium</i> detectadas pela gota espessa e pela <i>multiplex</i> -PCR.	49
Tabela 9	Comparação dos resultados das espécies de <i>Plasmodium</i> detectadas pela semi-nested-PCR e pela <i>multiplex</i> -PCR.	51
Tabela 10	Comparação dos resultados de determinação da espécie de <i>Plasmodium</i> obtidos pela nested-PCR e pela <i>multiplex</i> -PCR.	53
Tabela 11	Comparação dos resultados de determinação da espécie de <i>Plasmodium</i> obtidos pela PCR em tempo real (<i>SYBR Green</i>) e pela <i>multiplex</i> -PCR.	54
Tabela 12	Coeficiente de Kappa na detecção da espécie <i>P. falciparum</i> pela <i>multiplex</i> -PCR e pela gota espessa.	55
Tabela 13	Coeficiente de Kappa na detecção da espécie <i>P. vivax</i> pela <i>multiplex</i> -PCR e pela gota espessa.	55
Tabela 14	Coeficiente de Kappa na detecção da espécie <i>P. malariae</i> pela <i>multiplex</i> -PCR e pela gota espessa.	56

Tabela 15	Coeficiente de Kappa na detecção da espécie <i>P. falciparum</i> pela <i>multiplex</i> -PCR e pela <i>semi-nested</i> -PCR.	57
Tabela 16	Coeficiente de Kappa na detecção da espécie <i>P. vivax</i> pela <i>multiplex</i> -PCR e pela <i>semi-nested</i> -PCR.	57
Tabela 17	Coeficiente de Kappa na detecção da espécie <i>P. malariae</i> pela <i>multiplex</i> -PCR e pela <i>semi-nested</i> -PCR.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

CDC	<i>“Centers for Disease Control and Prevention”</i>
COX I	Citocromo c oxidase I
COX III	Citocromo c oxidase III
COB ou CYTB	Citocromo B
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CRS	<i>“Conserved Region Sequences”</i> do genoma de <i>Plasmodium</i>
DNA	<i>“desoxyribonucleic acid”</i>
dNTP	Mistura dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
DHFR	<i>“dihydrofolate reductase”</i>
EDTA	<i>“Ethylene diamine tetracetic acid”</i>
IPA	Incidência parasitária anual
LAMP	<i>“Loop-mediated isothermal amplification”</i>
LSU	<i>“Large SubUnit”</i>
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MA	Marcador de alinhamento
NCBI	<i>“National Center for Biotechnology Information”</i>
mtDNA	<i>“Mitochondrial”</i> DNA
OMS	Organização Mundial da Saúde
MSTNPCR	<i>“Multiplex single tube nested PCR”</i>
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PAHO	<i>“Pan American Health Organization”</i>
PAS	<i>“printed-array strip”</i>
PCR	<i>“Polymerase Chain Reaction”</i>

qsp	quantidade suficiente para
RDTs	<i>“Rapid Diagnostic Tests”</i>
qPCR	<i>“Quantitative Polymerase Chain Reaction”</i>
QT-NASBA	<i>“Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Assay”</i>
rRNA	<i>“ribosomal”</i> RNA
snPCR-K	Semi <i>nested</i> PCR-Kimura
STEVR	<i>“subtelomeric variant open reading frame”</i>
STH	<i>“Single-stranded Tag Hybridization”</i>
SOC	meio super ótimo com repressão de catabólitos
SSU	<i>“Small SubUnit”</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
tRNA	<i>“transfer”</i> RNA
UV	Ultravioleta
varATS	<i>“var gene acidic terminal sequence”</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

bp	<i>“base pair”</i>
<i>g</i>	aceleração da gravidade
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
nm	nanomolar
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
U	unidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico da malária	1
1.2 Aspectos gerais da malária humana	1
1.3 Agente etiológico	4
1.4 Principais diferenças entre infecção por <i>P.vivax</i> e <i>P. falciparum</i> e associação com a gravidade da doença	8
1.5 Infecção por <i>P. malariae</i>	9
1.6 Suscetibilidade à malária.....	11
1.7 Diagnóstico laboratorial da malária humana.....	11
1.8 Biologia molecular de <i>Plasmodium sp.</i>	14
1.9 Genoma mitocondrial.....	15
1.9.1 Diagnóstico molecular da malária.....	18
2 HIPÓTESE DO ESTUDO	22
3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	23
4 OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo geral.....	24
4.2 Objetivos específicos	24
5 MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1 Casuística	25
5.2 Aspectos éticos.....	26
5.3 Extração de DNA genômico	26
5.4 Determinação da concentração de DNA nas amostras	27
5.5 Delineamento dos <i>primers</i> da <i>multiplex</i> -PCR.....	27
5.6 Alinhamento dos três genes mitocondriais das espécies <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> e <i>P. malariae</i> e localização dos <i>primers</i>	28

5.7 Detecção do material amplificado por eletroforese capilar.....	32
5.8 Determinação do limite de detecção (sensibilidade analítica)	33
5.9 Teste de especificidade da <i>multiplex</i> -PCR.....	33
5.9.1 Clonagem dos fragmentos de <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> e <i>P. malariae</i>	34
5.9.2 Obtenção de células competentes <i>Escherichia coli</i>	34
5.9.3 Ligação do inserto ao vetor	35
5.9.4 Transformação de bactérias <i>Escherichia coli</i>	35
5.9.5 Cálculo do número de cópias do plasmídeo contendo o inserto das espécies <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> e <i>P. malariae</i>	36
5.9.6 Sequenciamento dos produtos de amplificação da <i>multiplex</i> -PCR	37
5.9.7 Cálculo amostral e análise estatística.....	38
6 RESULTADOS.....	40
6.1 Padronização das três amplificações em separado.....	40
6.2 Padronização dos ciclos de amplificação.....	41
6.3 Cálculo do número de cópias do plasmídeo contendo o inserto	42
6.4 Avaliação da sensibilidade analítica (limite de detecção) da <i>multiplex</i> -PCR para as três espécies de <i>Plasmodium</i>	42
6.5 Avaliação da especificidade da <i>multiplex</i> -PCR	43
6.6 Sequenciamento dos três controles positivos clonados utilizados na <i>multiplex</i> - PCR.....	44
6.7 Resultados das amostras de pacientes analisadas pelos testes de referência	47
6.8 Resultados da <i>multiplex</i> -PCR em relação à gota espessa.....	48
6.9 Resultados da semi-nested-PCR em relação a <i>multiplex</i> -PCR	51
6.9.1 Resultados da nested-PCR em relação a <i>multiplex</i> -PCR	53
6.9.2 Resultados da PCR em Tempo Real em relação a <i>multiplex</i> -PCR	54
6.9.3 Eletroforese capilar de amostras clínicas com infecção por <i>Plasmodium</i>	58
6.9.4 Sequenciamento dos produtos de amplificação de algumas amostras clínicas	

do estudo	60
6.9.5 Comparação dos resultados das amostras de doadores de banco de sangue obtidos por semi- <i>nested</i> -PCR (snPCR-K) e pela <i>multiplex</i> -PCR	64
7 DISCUSSÃO	65
8 CONCLUSÕES	81
9 PERSPECTIVAS DO ESTUDO.....	82
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXOS	93
A. Aprovação da Comissão de Pesquisa e Ética	93
B. Aprovação da Comissão de Pesquisa e Ética	94
C. Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa	95
D. Aprovação da Comissão de Pesquisa e Ética	96
E. Análise do <i>primer forward</i> de <i>P. falciparum</i> no programa BLAST	97
F. Análise do <i>primer reverse</i> de <i>P. falciparum</i> no programa BLAST	98
G. Análise dos <i>primers forward/reverse</i> de <i>P. falciparum</i> no programa BLAST	99
H. Análise do <i>primer forward</i> de <i>P. vivax</i> no programa BLAST	100
I. Análise do <i>primer reverse</i> de <i>P. vivax</i> no programa BLAST	101
J. Análise dos <i>primers forward/reverse</i> de <i>P. vivax</i> no programa BLAST	102
K. Análise do <i>primer forward</i> de <i>P. malariae</i> no programa BLAST	103
L. Análise do <i>primer reverse</i> de <i>P. malariae</i> no programa BLAST	104
M. Análise dos <i>primers forward/reverse</i> de <i>P. malariae</i> no programa BLAST	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO DA MALÁRIA

A infecção malárica acompanha os seres humanos há aproximadamente 50 mil anos e surgiu em primatas, ancestrais do homem na África, na região onde se encontra atualmente a Etiópia. Do Nilo, a malária se espalhou para a região do Mediterrâneo e, em seguida, para a Ásia e norte da Europa. No início do século XVIII, a malária já se encontrava distribuída por todos os continentes¹.

O padrão de febre associado a esplenomegalia e a característica epidêmica da infecção malárica foram descritos 2.700 anos antes de Cristo por chineses, e mais tarde, por sumérios, assírios, babilônicos, egípcios, indianos, gregos, romanos e árabes. Hipócrates (460-377 a.C.) foi o primeiro a descrever os sinais e sintomas da malária incluindo calafrios, febre e sudorese, e as diferentes formas clínicas da doença de acordo com a periodicidade da febre¹.

A etimologia da palavra “malária” vem do termo italiano medieval “mal’aria” que significa “ar ruim”. Essa expressão foi utilizada fora da Itália para descrever uma doença caracterizada pela ocorrência de febre nos meses de verão, e que era muitas vezes fatal. Horace Walpole descreveu o termo italiano que significava “um mal chamado mal’aria, horrível para quem vem a Roma, todos os verões matando um”. Somente no século XX a palavra malária, sem apóstrofo, tornou-se conhecida como o nome dado a doença².

1.2 ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA HUMANA

A malária é a doença infecciosa mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais, constituindo grave problema de saúde pública no mundo. Aproximadamente 40% da população mundial vive em áreas que apresentam risco de transmissão da infecção.

Considerando a malária no mundo, foram notificados 239 milhões de casos em 2010; 217 milhões em 2016 e 219 milhões de casos em 2017. Muito embora tenha havido cerca de 20 milhões de casos de malária a menos em 2017 em relação a 2010, a queda anual que vinha ocorrendo há algum tempo não se concretizou entre 2016 e 2017, tendo havido incremento de 2 milhões de casos neste período. Crianças menores de 5 anos são o grupo mais vulnerável a malária. Em 2017, 61% (266.000) das mortes por malária no mundo³ ocorreram nesta faixa etária.

No Brasil, entre 2000-2014, foi registrada redução de 76,8% na incidência de malária, mas a transmissão permanece entrincheirada na Bacia Amazônica⁴.

Segundo o Ministério da Saúde, em 2016, foram notificados 129.195 casos de malária em todo o país (Tabela 1), representando uma redução de 9,7% em relação a 2015 (143.161 casos). Na comparação dos últimos 10 anos, a redução foi de 76,5%, uma vez que em 2006 foram registrados 550.847 mil casos da doença. Em relação ao número de óbitos por malária, também houve queda expressiva (67,6%), passando de 105 em 2006 para 34 em 2015⁵.

O Brasil vinha apresentando redução no número de casos de malária a cada ano como resultado do esforço conjunto empreendido pelo Ministério da Saúde, e em 2015 um levantamento do Ministério da Saúde apontou que o país registrou o menor número de casos dos últimos 35 anos. Apesar dos avanços, há necessidade de aprimoramento dos processos de prevenção e controle da doença, envolvendo a capacitação de recursos humanos, além da correta identificação de casos e rápida contenção de surtos de malária^{4,6}. Infelizmente, em 2017 o número de casos de malária chegou a 174.522, representando um aumento de 48% em relação a 2016, acabando com a série histórica de redução anual do número de casos de malária no Brasil. O Estado mais afetado foi o Amazonas, com cerca de 74.000 casos em 2017, seguido por Pará e Acre, segundo dados epidemiológicos atualizados da Organização Pan-Americana de Saúde⁷.

Tabela 1 – Notificação de casos de malária no Brasil no ano de 2016.

ESTADO	NÚMERO DE CASOS
Acre (AC)	35.175
Amazonas (AM)	49.148
Amapá (AP)	12.273
Maranhão (MA)	766
Mato Grosso (MT)	519
Pará (PA)	14.493
Rondônia (RO)	7.328
Roraima (RR)	8.969
Tocantins (TO)	23
Alagoas (AL)	2
Bahia (BA)	20
Ceará (CE)	15
Distrito Federal (DF)	28
Espírito Santo (ES)	48
Goiás (GO)	45
Minas Gerais (MG)	54
Mato Grosso do Sul (MS)	5
Paraíba (PB)	3
Pernambuco (PE)	18
Piauí (PI)	23
Paraná (PR)	16
Rio de Janeiro (RJ)	51
Rio Grande do Norte (RN)	4
Rio Grande do Sul (RS)	10
Santa Catarina (SC)	15
Sergipe (SE)	5
São Paulo (SP)	139
TOTAL	129.195

Fonte: Reproduzida de Ministério da Saúde⁵.

1.3 AGENTE ETIOLÓGICO

Mais de 100 espécies de *Plasmodium* infectam numerosas espécies de animais, tais como répteis, aves, mamíferos, e cinco espécies de *Plasmodium* podem infectar o homem em condições naturais: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*⁸⁻¹⁰. Estas três espécies, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* têm menor distribuição global e menores taxas de morbidade e mortalidade em comparação a *P. falciparum* e *P. vivax*⁹. *P. falciparum* é o mais patogênico, produzindo a febre terçã maligna (ciclo de 48 horas), caracterizada por grande intensidade, podendo levar a morte se a infecção não for diagnosticada e tratada precocemente, principalmente em indivíduos infectados pela primeira vez (primo infecção). Por outro lado, *P. vivax*, agente da febre terçã benigna, raramente produz infecções fatais, mas possui ampla distribuição no mundo, sendo a espécie mais prevalente na maioria das regiões que apresentam malária fora do continente africano, inclusive no Brasil. *P. ovale* é responsável por outra forma de febre terçã benigna, porém permanece restrito ao continente africano. *P. malariae* causa febre quartã (ciclo de 72 horas) e, apesar de ser encontrado no mundo todo, acredita-se que apresente distribuição geográfica muito pontual⁵.

Uma das formas de se medir o risco de malária é utilizando a Incidência Parasitária Anual (IPA) que expressa o número de exames positivos para malária por mil habitantes (hab.), em um determinado local, a cada ano, sendo o resultado classificado como alto risco ($\text{IPA} \geq 50$ casos/1.000 hab.), médio risco ($10 \leq \text{IPA} \leq 49$ casos/1.000 hab.) ou baixo risco ($\text{IPA} < 10$ casos/1.000 hab.)¹¹.

Figura 1 – Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2017. Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS. Dados preliminares, sujeitos à alteração¹².

Dos casos clínicos de malária anualmente notificados na região Amazônica, *P. vivax* foi responsável por 83,7% de todos os casos em 2014, enquanto *P. falciparum* e infecções mistas foram responsáveis por 16,3% dos casos, tendo sido o *Plasmodium malariae* raramente observado^{13,14}. O vetor primário da malária na Amazônia é o *Anopheles darlingi*. Em 2014, homens foram mais afetados pela malária em relação a mulheres, em todas as faixas etárias, representando 60,4% dos casos confirmados. Neste mesmo ano, a incidência de malária entre mulheres grávidas foi de 93 casos por 100.000 gestantes por ano, incidência 1,75 vezes maior que a encontrada em mulheres não grávidas em idade fértil. Nos dois gêneros (masculino e feminino), crianças com idade entre 5-9 anos tiveram a maior incidência²⁷.

Apesar da infecção causada por *P. vivax* ser a mais prevalente nas Américas e na Ásia, é menos estudada possivelmente pelo fato da espécie *vivax* ser considerada menos patogênica que a *falciparum*, além da impossibilidade de isolamento e manutenção da

espécie *vivax in vitro*, muito embora alguns estudos mais recentes tenham sido capazes de adaptar determinadas linhagens eritroides *in vitro* (hemácias de indivíduos portadores de hemocromatose, eritrócitos de macacos e reticulócitos provenientes da maturação de células tronco hematopoiéticas CD34 +) infectadas por *P. vivax*, alcançando parasitemias > 0,5%.

O ciclo de vida do parasito no hospedeiro vertebrado se inicia no momento da picada quando o mosquito infectado inocula esporozoítos de *Plasmodium*. Alguns desses parasitos, por meio de intensos movimentos na derme, encontram vasos sanguíneos e linfáticos e reduzem seu movimento. Carregados pela circulação sanguínea, atingem o fígado e invadem hepatócitos, onde se modificam dando origem a formas mais arredondadas do parasito. Por intermédio de reprodução assexuada são formados esquizontes hepáticos, com formação de milhares de merozoítos. Estes são liberados na corrente circulatória do hospedeiro e rapidamente invadem hemácias, iniciando o ciclo intra-eritrocítico assexuado, responsável pelas manifestações da doença. Os parasitos se desenvolvem dentro do vacúolo parasitóforo, onde se alimentam de hemoglobina, passando por vários estágios. O primeiro estágio é chamado de anel e, após ter seu citoplasma aumentado, se transformam em trofozoítos, a seguir em esquizogonias por meio de um processo de divisão celular denominado esquizogonia. Após a ruptura dos eritrócitos, os novos merozoítos são liberados na circulação sanguínea e invadem novas células, dando continuidade ao ciclo e ao processo infeccioso. No entanto, alguns parasitos não iniciam o processo de divisão celular e se diferenciam nas formas sexuadas, os gametócitos masculinos e femininos. Quando ingeridos pelo mosquito no momento do repasto sanguíneo, alcançam o trato digestório do inseto, local onde as hemácias são digeridas e os gametócitos liberados. Os gametócitos masculinos (microgametócitos) sofrem três mitoses, dando origem a oito células que sofrem um processo de exflagelação e se transformam nos gametas masculinos. Ocorre a fecundação com a fusão dos gametas masculino e feminino, formando o zigoto, única forma diploide do parasito. Este, se diferencia em oocineto, forma ameboide capaz de atravessar a membrana peritrófica e se instalar na parede interna do trato digestório, entre o epitélio e a lâmina basal. O oocineto forma um envoltório protetor se transformando num oocisto, que sofrerá uma primeira

meiose redutora seguida de inúmeras mitoses, liberando os esporozoítos haploides na hemolinfa do inseto. Estes esporozoítos migram e se instalam na glândula salivar do mosquito até que este realize um novo repasto sanguíneo, podendo então infectar outro indivíduo⁷.

Os parasitos que entram no sistema linfático podem atingir o linfonodo mais próximo e se transformam numa forma semelhante ao estágio inicial do esquizonte hepático, entretanto não completam o processo de divisão e amadurecimento celular. Este novo estágio exo-eritrocítico no linfonodo foi recentemente descrito e sua importância no estabelecimento da infecção e na resposta imune do hospedeiro ainda permanece obscura⁷. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, após invadirem o hepatócito, os esporozoítos podem permanecer em estágio de dormência, os denominados hipnozoítos. Estes, podem iniciar sua replicação após meses, dando origem a esquizontes hepáticos que liberarão merozoítos na circulação, capazes de desenvolver novo ciclo intra-eritrocítico, acarretando novas manifestações clínicas denominadas recidivas⁵.

Figura 2 – Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* infectantes ao homem. Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC, EUA)¹⁵.

1.4 PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE INFECÇÃO POR *P. vivax* E *P. falciparum* E ASSOCIAÇÃO COM A GRAVIDADE DA DOENÇA

Em sua forma mais frequente, a malária não grave, o quadro clínico dos indivíduos infectados costuma incluir febre de início abrupto, sudorese profusa e calafrios, em padrões geralmente cíclicos de acordo com o agente etiológico^{16,17}.

A malária grave, responsável pelo maior número de mortes nas regiões tropicais, tem sido alvo de muitos estudos, principalmente as infecções causadas por *P. falciparum*, espécie mais patogênica. No entanto, podem ser observadas diferenças nas manifestações da doença, com apenas uma parcela de indivíduos infectados desenvolvendo complicações graves, sendo as razões para esta diversidade de manifestações pouco conhecidas¹⁸. Em relação ao parasito, além da patogenicidade da cepa, pode-se destacar sua capacidade de multiplicação no hospedeiro vertebrado, pois para cada esporozoítio de *P. falciparum* que invade um hepatócito, 10.000 novos merozoítos são produzidos. Podemos destacar ainda os mecanismos de invasão utilizados pelos plasmódios para infectar as células sanguíneas. Durante o processo de invasão, foram observadas diferenças entre a infecção causada por *P. vivax* e por *P. falciparum* em relação ao tipo de célula do hospedeiro a ser infectada, e as interações ligante-receptor utilizadas na invasão¹⁶.

As principais características de *P. vivax* que a distinguem de outras espécies de *Plasmodium* são seu alto potencial de transmissão, a produção de gametócitos de forma precoce e contínua, comportamento de hibernação no fígado sob a forma de hipnozoítos, ciclo de vida mais curto e sua alta infectividade em vetores, fatores que constituem os principais obstáculos para o controle da malária¹⁹.

P. vivax invade preferencialmente as hemácias jovens, podendo este fato contribuir para as cargas parasitárias mais baixas observadas na infecção por essa espécie de parasito^{16,20}. Por outro lado, *P. falciparum*, invade hemácias em qualquer fase evolutiva²⁰, sendo capaz de invadir estas células por cinco vias diferentes²¹ estando associado a cargas parasitárias mais elevadas.

A infecção malárica pode apresentar amplo espectro de manifestações clínicas, desde formas assintomáticas, infecções que evoluem para a cronicidade e mais raramente, formas graves. Estudos em diversas áreas endêmicas para malária mostraram frequência de indivíduos assintomáticos em torno de 14% em vilarejos na África subsaariana, e de até 21% em populações ribeirinhas na Amazônia Legal Brasileira^{22,23}.

1.5 INFECÇÃO POR *P. malariae*

Plasmodium malariae possui baixa prevalência na América Latina (1%) e difere das outras espécies de *Plasmodium* por apresentar uma menor taxa de crescimento e infecções que cursam com parasitemias mais baixas. A infecção humana por *P. malariae* é muitas vezes assintomática e de longa duração, com estágios sanguíneos do parasito persistindo provavelmente por toda a vida. *P. malariae* é considerado um patógeno menos patogênico quando comparado ao *P. falciparum* e *P. vivax*, porém pode causar nefropatias crônicas²⁴.

De acordo com o relatório anual da iniciativa da malária amazônica AMI (Amazon Malaria Initiative) de 2014²⁵, o percentual de infecções por *P. malariae* na América Latina foi de apenas 0,1% considerando o Brasil, Colômbia, Costa Rica, Guiana Francesa, Guiana, Peru e Venezuela. No entanto, a real prevalência de *P. malariae* na região pode ter sido subestimada devido à difícil diferenciação morfológica entre *P. malariae* e *P. vivax* na microscopia, bem como a presença de parasitemias baixas em infecções mistas, fazendo com que apenas a(s) outra(s) espécie(s) seja(m) identificada(s).

No início dos anos 1970, *P. malariae* foi identificado em mais de 80% de todas as amostras positivas para *Plasmodium* em uma população ameríndia isolada no Sudeste do Peru, com alguns casos de infecção mista por *P. malariae* e *P. vivax*. Utilizando uma *nested-Polymerase Chain Reaction* (PCR) que tem como alvo uma sequência específica das espécies de *Plasmodium* presente no gene que codifica a SSU rRNA ou 18S rRNA (pequena subunidade ribossomal de 18 Svedberg, também conhecida como **Small Sub Unit**), amostras de sangue de 497 indivíduos que residiam em uma área endêmica da bacia amazônica brasileira foram testadas e um relatório de 2004 revelou 11,9% (59 de 497) de

casos positivos para *P. malariae*, enquanto o exame microscópico das mesmas amostras encontrou apenas 1,2% (6/497 amostras)²⁴.

Recentemente, em uma região da Amazônia colombiana, as infecções por *P. malariae* corresponderam a quase metade (43,8%) de todos os casos sintomáticos de malária testados por *nested*-PCR (18S rRNA). O estudo revelou que 35,8% da população apresentava infecção mista com duas espécies de parasitos e a associação *P. vivax*/*P. malariae* correspondeu a 79,2% destas infecções mistas. Como nenhum caso de *P. malariae* foi relatado na Colômbia em 2015, os autores deste estudo sugeriram ter havido sub-deteção pelo método padrão-ouro, a gota espessa (microscopia), resultando na não identificação de infecção mista provavelmente devido a baixas parasitemias²⁴.

Um relatório ainda mais recente contendo dados da Colômbia mostrou que infecções por *P. malariae* não foram detectadas por microscopia, apenas por *nested*-PCR. Ademais, foram descritos casos somente de *P. malariae* e foram encontrados casos de infecções mistas *P. malariae*/*P. vivax* e *P. malariae*/*P. falciparum*. Embora *P. malariae* esteja presente em pequenos focos de comunidades da costa colombiana do Pacífico, estudos transversais realizados recentemente em várias localidades endêmicas desta região, usando a *nested*-PCR, não conseguiram identificar *P. malariae*²⁴.

Uma compilação de relatórios publicados entre 1971 e 2016 sobre a malária transmitida por transfusões sanguíneas nas Américas mostrou que mais da metade dos casos de malária em que as espécies de *Plasmodium* foram identificadas haviam sido causados por *P. malariae* (58,4%), infecção mista *P. malariae*/*P. vivax* (20,7%) ou por *P. falciparum* (17,9%), respectivamente. A maioria dos casos ocorreu no México (50,7%) e nos EUA (40,3%), seguidos pelo Brasil (6,6%). Dos casos detectados no Brasil (n = 28), a espécie de *Plasmodium* foi identificada apenas em três casos, todos causados por *P. malariae*²⁴.

1.6 SUSCETIBILIDADE À MALÁRIA

A maior parte das picadas de mosquitos infectados não produz infecção aparente, isto é, sintomatologia clássica incluindo febre e cefaleia. Alguns grupos apresentam maior suscetibilidade a infecção malárica, como por exemplo, crianças com menos de cinco anos de idade. Em crianças expostas a picadas, 25% permanecem assintomáticas e outras 25% apresentam infecção sem gravidade. Dentre os 50% que apresentam sintomas mais intensos, são raros os casos com manifestações de malária grave incluindo anemia intensa e acometimento do sistema nervoso central (malária cerebral), que podem evoluir para coma e óbito²⁶.

Fatores que determinam o desenvolvimento de infecção assintomática ou sintomática são importantes e devem ser esclarecidos. Diversos aspectos parecem estar relacionados a presença ou ausência de sintomas: taxa de inoculação do mosquito, dose infectante de esporozoítos, imunidade adquirida devido a infecções anteriores, patogenicidade do parasito, polimorfismos genéticos do hospedeiro humano, estado nutricional do indivíduo infectado, condições ambientais e acesso ao sistema de saúde para ser diagnosticado e receber tratamento²⁷.

1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA MALÁRIA HUMANA

O controle global da malária é baseado nos seguintes componentes: controle do vetor, acurácia do diagnóstico e tratamento de pacientes. Primeiramente descrito por Ross em 1903, a gota espessa é considerada 10 a 20 vezes mais sensível que o esfregaço, apresentando limiar de detecção, em condições ideais, de 10 a 50 parasitos/ μ L de sangue¹⁰⁸. Entretanto, existem dados mostrando que o diagnóstico e tratamento da malária baseados apenas em sintomas resultam no uso exagerado do arsenal terapêutico em pacientes que não têm malária. Esta prática acaba expondo os pacientes a tratamentos desnecessários, causando desperdício de recursos, podendo contribuir para o desenvolvimento de resistência aos medicamentos.

O diagnóstico laboratorial da malária é comumente realizado pelo exame da gota espessa com coloração de Giemsa²⁸. Trata-se de técnica simples, de baixo custo que também possibilita a quantificação da parasitemia, auxiliando no monitoramento da resposta ao tratamento e podendo ser usado como critério de cura, devido ao monitoramento da queda da parasitemia até o seu desaparecimento²⁹. Quando realizada por técnicos experientes, permite a identificação da espécie de *Plasmodium* infectante, porém a ocorrência de hemólise durante o preparo das lâminas dificulta a identificação adequada dos parasitos que sofrem alterações de forma, podendo levar a erros de identificação entre as espécies de *Plasmodium*, principalmente entre *P. malariae* e *P. vivax* devido a semelhança morfológica das duas espécies³⁰⁻³², resultando na provável subnotificação de infecções causadas por *P. malariae*, pelo fato de *P. vivax* ser mais prevalente em nosso meio.

Dentre as metodologias laboratoriais propostas atualmente existem os testes imunocromatográficos ou testes rápidos (RDTs – *Rapid Diagnostics Tests*) e protocolos de detecção molecular baseados na PCR, que têm se mostrado mais sensíveis que a microscopia^{28,29}.

A Organização Mundial da Saúde³³ recomenda o diagnóstico imediato de malária por microscopia ou testes imunocromatográficos (testes rápidos) em todos os pacientes com suspeita da infecção, antes de ser iniciado o tratamento. O diagnóstico laboratorial melhora a gestão de todos os pacientes com doenças febris, podendo ajudar a reduzir o surgimento e a propagação da resistência aos medicamentos antimaláricos. Nesse sentido, o número de pacientes submetidos ao exame microscópico no mundo em 2014 foi de 203 milhões, com maioria dos testes realizados na Índia, país que respondeu por mais de 120 milhões de lâminas examinadas. No que se refere ao continente africano, líder em número de casos de malária, a quantidade de pacientes examinados por microscopia ainda é relativamente baixa, apesar de ter aumentado nos últimos quatro anos. Grande parte do aumento em diagnósticos nesta área se deve ao uso de testes rápidos (RDTs), que foram responsáveis por aproximadamente 45% dos casos detectados em 2014³³.

No exame microscópico (gota espessa - GE) a avaliação da quantidade de parasitos no sangue é realizada de forma quantitativa, porém caracterizando a intensidade

da parasitemia em cruces (Tabela 2). A estimativa da parasitemia encontrada é feita por microlitro (μL) de sangue, com 100 campos equivalendo a 0,2 μL de sangue.

Tabela 2 – Estimativa da parasitemia a partir da avaliação quantitativa (microscopia).

Parasitos/campo	Cruces	Parasitos/ μL
0,4 a 0,6	$\frac{1}{2} +$	200 - 300
1	+	301 - 500
2 – 20	++	501 – 10.000
21 – 200	+++	10.001 – 100.000
+ 200	++++	Mais de 100.000

Fonte: Manual de diagnóstico laboratorial da malária, SVS/MS³⁴.

Estudos recentes têm mostrado que a microscopia também possui limitações no que diz respeito aos casos com baixas parasitemias e nas infecções mistas. No estudo de Lucchi e colaboradores (2013) o limiar de detecção da leitura microscópica variou entre 50-100 parasitos/ μL de sangue, dependendo da experiência do microscopista, dentre outros fatores^{35,36}. Além disso, tem sido demonstrado que gametócitos submicroscópicos, que também são capazes de transmitir malária, só podem ser detectados por métodos moleculares³⁷. Desta forma, a pequena quantidade de parasitos muitas vezes passa despercebida na gota espessa, gerando resultados falso-negativos. Ademais, as similaridades morfológicas existentes entre estágios jovens dos parasitos causadores de malária de diferentes espécies podem confundir o microscopista, que acaba liberando um resultado equivocado, principalmente em casos de infecção mista^{38,39}.

Estudos realizados em áreas endêmicas de malária têm mostrado que em alguns locais o número de residentes com parasitemia patente pode ser inferior àquele de infecções sub-patentes que podem persistir por vários meses⁴⁰. Além disso, considera-se que pessoas previamente imunes, novamente infectadas por *Plasmodium sp*, possam apresentar infecções sub-patentes com maior frequência¹³. Casos como estes diminuem as taxas de detecção na gota espessa, tornando difícil a identificação de espécies devido à baixa quantidade de parasitos e permitindo a manutenção do ciclo da malária, com tais indivíduos atuando como reservatórios⁴¹.

1.8 BIOLOGIA MOLECULAR DE *Plasmodium sp.*

Plasmodium sp possui DNA nuclear e extra-nuclear, este último presente no apicoplasto e na mitocôndria. (Figura 3).

Figura 3 – DNA nuclear e extranuclear (apicoplasto e mitocondrial) de *Plasmodim vivax*⁴¹.

Todos os plasmódios possuem 14 cromossomos no genoma, porém, o tamanho do genoma nuclear não é o mesmo, variando de 23,3 Mb em *P. falciparum* a 27,01 Mb em *P. vivax*. O DNA do apicoplasto é circular e possui entre 34,7 e 35 kb, dependendo da espécie de plasmódio, contendo quatro genes que codificam RNA ribossomal (rRNA)⁴².

P. falciparum possui 19,1% de nucleotídeos C e G no núcleo, 10% nas regiões intergênicas e cerca de 30% de C e G no genoma mitocondrial. Em relação a *P. falciparum*, a espécie *vivax* possui genoma muito mais rico em nucleotídeos C e G (42,3%) no genoma nuclear^{43,44}.

1.9 GENOMA MITOCONDRIAL

Os genomas mitocondriais dos parasitos do filo Apicomplexa são circulares e altamente diversificados em estrutura e organização. Os plasmódios possuem o menor genoma mitocondrial conhecido (6 kb) contendo apenas três genes que codificam as enzimas citocromo c oxidase I (cox I), citocromo c oxidase III (cox III) e citocromo b (cob ou cytb). (Figura 4).

Figura 4 – Organização do genoma mitocondrial de *Plasmodium* de aproximadamente 6 Kb. Foram representados os três genes mitocondriais (cox I, cox III e cytb). FONTE: Adaptado de Délicat-Loembet *et al.*⁴⁵; pb- pares de base.

Além das seqüências que codificam os genes cox I, cox III e cytb, o genoma mitocondrial dos plasmódios contém vários fragmentos das subunidades grande (Large Sub Unit - LSU) e pequena (Small Sub Unit- SSU) de genes que codificam RNA ribossomal (rRNA). Apesar da natureza pouco convencional destes fragmentos de rRNA, análises de transcritos produzidos pelo genoma mitocondrial de plasmódios sugere que além dos três genes que codificam enzimas, os fragmentos curtos de rRNA também sejam funcionais.

Com apenas algumas exceções, os genomas mitocondriais de vertebrados são constituídos por moléculas circulares de 15-20 kb contendo os mesmos 37 genes: 2 genes que codificam a grande subunidade ribossomal (LSU) e a pequena subunidade ribossomal

(SSU) do rRNA (também conhecida como 18S rRNA), 13 genes que codificam proteínas e 22 genes que codificam RNA de transferência (tRNA)⁴².

Os genes que codificam *cytb* e *cox I* se localizam na fita *forward* (*sense*) do genoma mitocondrial dos plasmódios, enquanto *cox 3* está presente na fita *reverse* (*antisense*), entre fragmentos LSU e SSU (Figura 5).

Figura 5 – Organização do genoma mitocondrial de genes que codificam proteínas mitocondriais (*cox I*, *cox III* e *cytb*). A seta indica a direção da transcrição. As abreviações LSU e SSU indicam fragmentos da subunidade maior e fragmentos da subunidade menor do gene rRNA, respectivamente. Fonte: Sharma *et al.*⁴⁶.

A análise do genoma mitocondrial de 23 espécies de plasmódios mostrou que a estrutura e organização do genoma mitocondrial é extremamente bem conservada entre espécies, com similaridade de sequências nucleotídicas variando de 84 a 99%, possibilitando a seleção de sequências muito bem conservadas em todas as espécies, ideais para o emprego em testes com finalidade diagnóstica, além de outras sequências que são específicas para cada espécie⁴² e poderiam ser usadas para a determinação da espécie infectante.

O genoma mitocondrial (mt) é utilizado como marcador em estudos de evolução de microrganismos devido a sua herança materna e o fato do DNA mitocondrial não sofrer recombinações ou rearranjos genéticos, fazendo com que se comporte como um único *locus* formado por inúmeros genes e fragmentos encurtados de genes que compartilham uma genealogia comum, tornando-o ideal para estudos filogenéticos e de diferenciação de espécies⁴⁷.

Em parasitos causadores de malária, o genoma mitocondrial é de particular relevância para o diagnóstico devido ao seu pequeno tamanho (6 kb) e o fato de conter

apenas três genes (cox I, coxIII e cytb) que codificam enzimas essenciais a uma variedade de processos celulares^{47,48}.

Uma inegável vantagem dos genes mitocondriais para o diagnóstico molecular é que todos os genes que compõem o genoma mitocondrial estão presentes em número elevado de cópias dispostas de forma contígua ou em *tandem*, em torno de 20 - 150 cópias por parasito, quantidade superior a do gene que codifica a subunidade 18S do rRNA parasitário, alvo preferencial das amplificações até o momento, presente em 4-8 cópias por parasito, apresentando desta forma um grande potencial para ser aplicado ao diagnóstico molecular da malária⁴⁹.

O genoma mitocondrial de parasitos da malária está presente em múltiplas cópias, porém todas dentro de uma única mitocôndria. Para o *P. falciparum*, o número total por parasito em fase anelar é de cerca de 20 genomas mitocondriais, dispostos em matrizes lineares de 3 a 4 unidades. A replicação do genoma mitocondrial ocorre simultaneamente com o genoma nuclear, cerca de 24 horas após a invasão. Apesar de existir enorme potencial de ganho de sensibilidade nas amplificações realizadas com *primers* de genes mitocondriais de *Plasmodium*, já que existem múltiplas cópias de DNA mitocondrial (mtDNA), vale a ressalva de que as múltiplas cópias não estão distribuídas independentemente em vários cromossomos do parasito. No *P. falciparum*, a espécie com menor número de cópias de mtDNA, todo o genoma mitocondrial se encontra em 6 moléculas, cada uma delas composta de 3 a 4 unidades de repetição em série (*tandem*) (Figura 6).

Figura 6 – Exemplo da disposição de repetições em *tandem*. Adaptado de Musunuru *et al.*⁵⁰

1.9.1 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA MALÁRIA

Técnicas baseadas na detecção de DNA têm revolucionado a identificação de patógenos nos últimos 30 anos, abrindo novas perspectivas para o diagnóstico de várias doenças parasitárias. A PCR é capaz de identificar o material genético alvo em um processo cíclico que gera milhares de cópias idênticas que poderão ser obtidas em pouco tempo⁵¹. Muitos protocolos têm sido desenvolvidos em busca de métodos complementares ao exame microscópico. Nesse sentido, o diagnóstico molecular tem se mostrado promissor na detecção de *Plasmodium sp* por apresentar maior sensibilidade e especificidade, gerando resultados positivos até mesmo em infecções subclínicas⁵²⁻⁵⁴.

Nos testes moleculares com finalidade diagnóstica, as sequências de DNA do parasito consideradas ideais para amplificação são aquelas localizadas em regiões conservadas do genoma, que devem, portanto, estar presentes em todas as espécies do gênero *Plasmodium*. Além disso, deve-se dar preferência às sequências repetitivas, isto é, aquelas presentes em grande número de cópias por parasito porque elas permitirão a padronização de testes mais sensíveis. Se as repetições forem homogeneamente distribuídas pelos diferentes cromossomos parasitários em lugar de estarem todas concentradas, o teste também deverá funcionar de forma mais adequada em relação às sequências cujas repetições se apresentem em *tandem* (repetições contíguas, concentradas em um único local). Finalmente, o teste molecular ideal deveria ser capaz não apenas de detectar o gênero do parasito causador da infecção (*Plasmodium sp*), como também de definir a espécie de *Plasmodium* infectante, incluindo as espécies que são importantes na região geográfica que está sendo estudada. No Brasil, a maior parte dos casos de malária é causada pela espécie *vivax* e em segundo lugar pela espécie *falciparum*, esta última geralmente associada aos casos mais graves⁵⁵. No entanto, como a espécie *vivax* pode ser confundida na gota espessa com a *malariae*, e no Estado de São Paulo existem casos de infecção humana por *P. malariae* e por *P. vivax*^{56,57}, a diferenciação molecular das espécies *malariae*, *vivax* e *falciparum* merece atenção.

No âmbito do diagnóstico molecular da malária, a PCR tem sido utilizada tendo como alvo da amplificação, diferentes genes e regiões genômicas, tais como a 18S rRNA

(SSU rRNA), STEVOR (subtelomeric variant open reading frame), dois genes mitocondriais que codificam o citocromo c oxidase I (cox I) e cox III, a enzima dihidrofolato redutase (DHFR) e sequências provenientes de regiões conservadas do genoma de *Plasmodium* (CRS). Estas amplificações foram desenvolvidas em vários formatos de ensaio, como PCR aninhada (*nested*), *multiplex* PCR, amplificação isotérmica mediada por *loop* (Loop-mediated isothermal amplification – LAMP), ensaio quantitativo baseado em sequências de ácidos nucleicos (Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Assay - QT-NASBA), PCR Quantitativa (qPCR) ou em Tempo Real (Real Time PCR)⁵⁸.

Para o diagnóstico molecular de malária, algumas variações da PCR convencional têm sido descritas, incluindo a *nested*-PCR^{59,60}, com detecção do gênero após a primeira amplificação e da espécie de *Plasmodium* após a segunda amplificação. Protocolos de Real Time PCR têm sido muito utilizados^{38,61} por permitirem o monitoramento da amplificação e a quantificação do alvo de forma simultânea, com grande precisão e reprodutibilidade, maior rapidez e sensibilidade, dispensando a manipulação de amostras após a amplificação^{62,63}.

Mais recentemente, um novo método molecular para o diagnóstico de malária, baseado na amplificação isotérmica de DNA (LAMP - *Loop-Mediated Isothermal Amplification*) foi apresentado. LAMP é uma técnica aparentemente simples, rápida e que vem mostrando alta sensibilidade, com possibilidade de aplicação em pesquisas de campo por não necessitar de termociclador, bastando um banho-maria, possibilitando a detecção do gênero e a diferenciação das espécies de *Plasmodium* em locais nos quais os recursos são escassos^{36,55,64,65}. Os resultados são visualizados por turbidez ou fluorescência, dispensando manipulação após a amplificação.

A PCR para o diagnóstico de malária foi primeiramente descrita em 1989 por Waters & McCutchan utilizando *primers* gênero e espécie-específicos selecionados na sequência 18S rRNA. Desde então, o diagnóstico molecular da malária tem se baseado preferencialmente na detecção de fragmentos desta sequência 18S rRNA caracterizada por regiões polimórficas (usadas para a diferenciação de espécies), flanqueadas por regiões conservadas (usadas para a detecção do gênero *Plasmodium*). Por esse motivo, o

18S rRNA de várias espécies de *Plasmodium* foi clonado e sequenciado, facilitando o delineamento de novos *primers*⁵⁹. Entretanto, análises posteriores da sequência 18S rRNA de alguns plasmódios revelaram número de cópias do gene ainda mais baixo (normal de 4 a 8 cópias/parasito) e que eram divergentes dos 18S rRNA conhecidos até então, podendo gerar resultados falso-negativos⁶⁶. Considerando que a sensibilidade da PCR está diretamente relacionada à quantidade inicial da sequência-alvo de amplificação presente na amostra, o número reduzido de cópias desta sequência nos parasitos limitaria a detecção, notadamente nas infecções com baixa parasitemia. Embora as sequências genômicas das espécies *P. falciparum* e *P. vivax* estejam disponíveis (PlasmoDB - www.plasmodb.org), a maioria dos métodos de diagnóstico baseados na PCR, ainda nos dias de hoje, recorre à amplificação de fragmentos da sequência 18S rRNA.

Em busca de novos alvos promissores para o diagnóstico molecular da malária, foram descritas duas sequências, Pvr 47 e Pfr 364, presentes em *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente, que não codificam proteínas ou as proteínas ainda não têm função conhecida⁵³. A sequência Pfr 364 está presente em 41 cópias no genoma de *P. falciparum* e as múltiplas cópias estão localizadas em regiões subteloméricas SB2 da maior parte dos cromossomos do parasito. Com relação a Pvr 47, 14 cópias se encontram distribuídas pelo genoma de *P. vivax*. Estes alvos foram descritos como promissores para a detecção de *P. vivax* e *P. falciparum*, tendo sido utilizados em amplificações convencionais, com apenas uma amplificação⁵³.

No Quadro 1 apresentamos um resumo dos trabalhos publicados nos últimos 10 anos, que utilizaram como alvo os genes que codificam 18SrRNA, *cytB*, *cox I* e *cox III* para o diagnóstico molecular da malária.

Quadro 1 – Resumo dos trabalhos publicados que utilizaram como alvo os genes que codificam 18S rRNA, cytb, cox I e cox III para o diagnóstico molecular da malária.

Estudo	População (N)	Alvo	Técnica Molecular	Limite de detecção (sangue)	Conclusão do estudo
Rubio <i>et al.</i> , 1999 ⁶⁷	159	18S rRNA	sn <i>Multiplex</i> -PCR	0,1 parasito/μL	sn <i>Multiplex</i> -PCR mais sensível que GE.
Cunha <i>et al.</i> , 2009 ⁶⁸	88	cox I (Pv)	PCR	0,01 parasito/μL	PCR foi simples e mais sensível que GE
Steenkest <i>et al.</i> , 2009 ⁶⁹	337	cox III (Pf) 18S rRNA	nPCR	0,75 parasito/ μL	Os dois métodos foram altamente sensíveis
Veron <i>et al.</i> , 2009 ⁷⁰	263	cytb 18S rRNA	qPCR	0,075 parasito/μL 0,3-3,1 parasitos/μL	qPCR mais sensível e específica que <i>nested</i> -PCR
Putaporntip <i>et al.</i> , 2011 ⁷¹	693	cytb	nPCR	1 parasito/μL	nPCR mais sensível e específica que GE e PCR 18S rRNA
Farrugia <i>et al.</i> , 2011 ⁷²	265	cytb	qPCR	0,53-0,3 parasito/reação	qPCR apresentou alta sensibilidade
Guerreiro <i>et al.</i> , 2012 ⁷³	270	cox I cox III	qPCR	N/D	qPCR mais sensível que PCR sobretudo nas baixas parasitemias
Isozumi <i>et al.</i> , 2015 ⁷⁴	153	cox III	nPCR	1 parasito/200 leucócitos	nPCR mais sensível que PCR 18S rRNA
Xu <i>et al.</i> , 2015 ⁵²	2977	cytb	qPCR-RFLP	1-2 parasitos/reação	qPCR-RFLP foi igual ou superior as duas PCR de referência
Stanis <i>et al.</i> , 2016 ⁷⁵	129	cytb	<i>Multiplex</i> -PCR	N/D	<i>Multiplex</i> -PCR mais rápida na detecção das cinco espécies que infectam o homem
Echeverry <i>et al.</i> , 2016 ⁷⁶	21	cox III	PCR	0,6-2 parasitos/μL	PCR é rápida, sensível e confiável na identificação de Pf, Pv, Pm, Po
Srisutham <i>et al.</i> , 2017 ⁷⁷	102	18S rRNA	PCR	11 parasitos/mL	PCR muito sensível nas baixas parasitemias
Shahwani <i>et al.</i> , 2017 ⁷⁸	200	cox I	PCR	0,01 parasito/μL	PCR mais sensível e confiável que GE
Saito <i>et al.</i> , 2018 ⁷⁹	150	cox III cox III	<i>Multiplex</i> -nPCR	0,3 parasito	<i>Multiplex</i> -PCR mais rápida e sensível que as 2 PCR referência na identificação das cinco espécies que infectam o homem

GE= gota espessa; N/D= não determinado; Pf= *P. falciparum*; Pv= *P. vivax*; Pm = *P. malariae*; Po = *P. ovale*

2 HIPÓTESE DO ESTUDO

O novo sistema de amplificação do tipo *multiplex*-PCR que estamos propondo deverá ser capaz de detectar casos de malária previamente diagnosticados por *semi-nested* ou *nested*-PCR (18S rRNA), correspondendo a infecções causadas pelas espécies *falciparum*, *vivax* e *malariae*, sendo capaz de detectar infecções mistas, casos causados por *P. malariae* e casos com baixas parasitemias, de forma mais rápida pois será realizado em apenas uma amplificação, minimizando os riscos de contaminação das amostras (carry over) associadas ao uso de *nested*-PCR, com menor custo e exposição dos manipuladores a substâncias nocivas à saúde.

3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A malária pode ser transmitida por transfusão sanguínea de doadores assintomáticos e todos os casos deste tipo notificados desde 2005 no Brasil foram fatais. Uma boa ferramenta de triagem seria a detecção do parasito em unidades de sangue, devendo o teste possuir elevada sensibilidade, uma vez que a prevenção da malária transfusional depende da exclusão de doadores infectados. No entanto, em bancos de sangue brasileiros, a triagem de doadores se baseia na gota espessa⁸⁰.

O diagnóstico da malária é um dos pilares dos programas de prevenção e controle da infecção em todo o mundo e o diagnóstico laboratorial ideal deveria permitir a identificação precoce de casos e a caracterização da espécie, aspecto vital para a definição do esquema terapêutico, evitando mortes, tratamentos desnecessários e auxiliando a definição de políticas públicas^{41,81-83}.

Atualmente, muitas ferramentas de diagnóstico molecular são conhecidas, além das convencionais baseadas em microscopia^{84,85}. O diagnóstico microscópico (gota espessa) apresenta muitas limitações e dificuldades principalmente em casos com baixas parasitemias e nas infecções mistas^{41,86}.

A maior parte dos estudos para a detecção e caracterização das espécies de *Plasmodium* utilizou *primers* do gene que codifica a fração 18S do rRNA parasitário⁵³, presentes em 4-8 cópias por parasito. Cunha *et al.*⁶⁸, Shahwani *et al.*⁷⁸ e Saito *et al.*⁷⁹ utilizaram amplificações com detecção de genes mitocondriais de *Plasmodium* pelo fato destes contarem com número maior de cópias por parasito (20-150) em relação ao 18S rRNA, com resultados promissores.

Devido à presença de sequências repetitivas nos genes mitocondriais que são específicas para cada espécie de *Plasmodium*, a amplificação de três fragmentos espécie-específicos (um para a espécie *falciparum*, um para a espécie *vivax* e um para a espécie *malariae*) poderia resultar em técnica de maior sensibilidade e especificidade em relação ao 18S rRNA. Além disso, a utilização de um sistema do tipo *multiplex* com vários pares de *primers* em uma única etapa de amplificação, evitaria o uso de *nested-PCR*.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL:

- a) Desenvolver uma *multiplex*-PCR baseada na amplificação dos três genes mitocondriais de *Plasmodium* para o diagnóstico de malária e a diferenciação das três espécies mais relevantes no país (*falciparum*, *vivax* e *malariae*).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver uma *multiplex* PCR para a amplificação simultânea de três fragmentos de DNA espécie-específicos (*falciparum* – gene *cox III*; *vivax* gene *cox- I* e *malariae*- gene *cytb*);
- b) Testar amostras de DNA de indivíduos de áreas endêmicas de malária que tiveram diagnóstico confirmado da infecção pelas três espécies;
- c) Comparar os resultados da *multiplex*-PCR em relação àqueles obtidos com os testes de referência (gota espessa e *semi-nested*-PCR, gota espessa e *nested*-PCR ou ainda gota espessa e Real Time PCR, todas as técnicas realizadas com primers do 18S rRNA de *Plasmodium*).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CASUÍSTICA

Um total de 104 amostras de pacientes com diagnóstico confirmado de malária (gota espessa associada a semi-*nested*-PCR ou a *nested*-PCR) foram avaliadas. A descrição das amostras de DNA que foram testadas nesta pesquisa se encontra a seguir:

- a) 35 amostras de estudo da Dra. Sandra do Lago Moraes (CAPPesq processo 968/06, anexo 1). Estas 35 amostras possuem resultados confirmados por gota espessa e semi-*nested*-PCR segundo Kimura *et al.*⁸⁷, foram colhidas entre os anos de 1995 e 1996 e se encontram armazenadas em biorrepositório do laboratório;
- b) 25 amostras também provenientes de estudo da Dra. Sandra Moraes (CAPPesq processo 968/06, anexo 1), de pacientes com malária confirmada por *Plasmodium falciparum* (gota espessa e semi-*nested*-PCR segundo Kimura *et al.*⁸⁷ que foram internados e tratados com mefloquina;
- c) 38 amostras recentes de pacientes moradores de área endêmica do Acre com malária causada por *P. falciparum* (n= 17) e *P. vivax* (n =21). Os casos foram confirmados por Real Time PCR segundo Gonçalves *et al.*⁸⁸ Estas amostras foram gentilmente cedidas ao nosso laboratório pela equipe do Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo;
- d) Amostras recentes de pacientes com malária causada por *P. malariae* que foram gentilmente cedidas pela Dra. Sílvia di Santi, pesquisadora da SUCEN. Os casos foram confirmados por *nested*-PCR segundo Snounou *et al.*⁵⁹

Além das 104 amostras de pacientes com malária, foram testadas 47 amostras de um grupo de indivíduos com baixíssima probabilidade de apresentar malária composta

por doadores de Banco de Sangue (grupo sem infecção), todos moradores da cidade de São Paulo, sem histórico de infecções recentes ou viagens (deslocamento) a áreas endêmicas. Os doadores de Banco de Sangue tiveram amostras colhidas no âmbito de pesquisas sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Walter Ferreira, aprovadas pela CAPPesq (protocolo nº 439/01).

5.2 ASPECTOS ÉTICOS

A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP), processo nº 274/16 e finalmente pela Comissão de Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (CEP-FMUSP), processo nº 307/16.

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

O DNA das amostras de sangue obtidas há mais de 20 anos foi extraído em pesquisa anterior com técnica de fenol-clorofórmio, de acordo com protocolo descrito por Snounou *et al.*⁵⁹, modificado por Ferreira *et al.*⁸⁹. As amostras de DNA foram congeladas a -20°C e armazenadas em biorrepositório do laboratório.

A amostras de DNA que denominamos de “recentes” foram extraídas do sangue de pacientes com malária do Estado do Acre. A extração de DNA foi realizada com kit QIAmp DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

5.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA NAS AMOSTRAS

A estimativa da concentração de DNA foi realizada por espectrofotometria UV (Nanodrop 1000, Thermo Scientific), em comprimento de onda de 260 nm. A determinação da concentração de proteínas remanescentes na amostra foi realizada em 280 nm, o que permitiu o cálculo da relação 260/280 nm que deveria ser $\geq 1,2$. Adicionalmente, foi realizada leitura em comprimento de onda de 230 nm para verificação da presença de restos de solventes nas amostras de DNA.

5.5 DELINEAMENTO DOS *PRIMERS* DA *MULTIPLEX-PCR*

Tendo em vista que os genes mitocondriais dos plasmódios possuem grande similaridade de sequências nucleotídicas, variando de 84 a 99% entre as diferentes espécies^{42,71}, a presente pesquisa procurou analisar detalhadamente as poucas regiões que divergem entre as espécies, ou seja, as posições nucleotídicas nas sequências dos três genes mitocondriais que são espécie-específicas.

Os três pares de *primers* espécie-específicos foram selecionados manualmente após alinhamento das sequências que codificam os três genes mitocondriais de *Plasmodium* (cox III, cox I e cytb) pertencentes as três espécies (*falciparum*, *vivax* e *malariae*). Para tanto, além das regras que são seguidas para a seleção de qualquer *primer*, o delineamento dos *primers* de cox III, cox I e cytb foi feito de forma a alocar ao menos uma base dentre os três primeiros nucleotídeos da extremidade 3' do *primer* que só deveria se ligar a uma das espécies de *Plasmodium*. Se possível, deveria ainda existir outros nucleotídeos específicos de espécie ao longo da sequência do *primer*. Esta estratégia para delinear *primers* específicos para determinadas sequências é muito usado em genética, e é conhecida como ASO (*Allele Specific Oligonucleotide*) ou ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*). Nesse sistema, é utilizado um par de *primers* com sequência específica na extremidade 3' para cada alelo presente no locus gênico que está sendo estudado^{90,91}. Um *primer* ASO possui tipicamente 15 a 21 bases nucleotídicas de comprimento e é delineado de maneira a torná-lo específico para apenas um alelo, do gene

que está sendo testado. Esses *primers* podem ser escolhidos com diferenças de apenas uma base na sequência alvo, neste caso usado para a detecção de polimorfismos de nucleotídeo único (Single Nucleotide Polymorphism- SNP). Em geral, os nucleotídeos discriminatórios se encontram na extremidade 3' do *primer*⁹⁰, mas diferenças em outras posições também podem resultar em amplificações específicas para determinados alelos, podendo a diferença nucleotídica existir em apenas um dos *primers* do par, neste caso utilizando um *primer* denominado comum que se liga a todos os alelos ou espécies e o outro *primer* alelo-específico⁹².

Figura 7 – Esquema de detecção de alelos específicos por PCR-ASO. Fonte: Hirata *et al.*⁹¹

5.6 ALINHAMENTO DOS TRÊS GENES MITOCONDRIAIS DAS ESPÉCIES *P. falciparum*, *P. vivax* E *P. malariae* E LOCALIZAÇÃO DOS PRIMERS

As figuras 8, 9 e 10 apresentam o alinhamento dos genes mitocondriais das três espécies (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*). As sequências de *cox III* foram usadas para a amplificação específica de *P. falciparum*; as sequências de *cox I* para *P. vivax* e as sequências de *cytb* para *P. malariae*, salientando a localização dos *primers* e das posições nucleotídicas para a amplificação específica de cada uma das três espécies.

```

P. falciparum  TTATTAATAATAATAACCTATTACTACATGAGAAAAATGTAATCCTGTAACACAATAAA
P. vivax      TTAAATAATAATAATAACCAACTATAACAATGTGAAAAATGTAACCTGTAAACACAATAAA
P. malariae  TTAAATAATAATAATAACCAATAATAACAATGTGAAAAATGTAACCTGTAAACACAATAAA
*** ***** * * ***** ***** *****

P. falciparum  ATAATGTAGTATATACAGTATCATTATATGATATGATAAATGTAAATACTCTGTAGTTT
P. vivax      ATAATGTACCAGATATAGCATCATTATACAAATCCTAAATGTAAAGTATTCAGTTGTTT
P. malariae  ATAATGTTCTCTGAAACTCCATCATTATAATAATTCTAAATGTAAATATTCAGTTGTC
***** * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * *

P. falciparum  GTAGAGATGCAAAACATTCTCCTAATAAGTATATTATACAAATAACTAGAGATTTCAA
P. vivax      GAAGTGATGCAAAACATTCTCCAAGTAAGTATATTATAAATACAACTAGAAATTTCTA
P. malariae  GTAAATGATGCAAAACATTCTCCAAGTAAATATATTATAAATATAACTTGATATTTCAA
* * ***** * * * * * * * * * * * * * * * *

P. falciparum  AACTCATTCCTTTTCTATAAATACTTGTAACATGCAGTCATACATGATGCAC TAGCTA
P. vivax      AACTCATTCCTTTTCTATTAGAAATGTAAACATGCCTGTCATACATGATGCAC TTGCTA
P. malariae  AACTCATACCTTTTCTAAAAGAAATGTAAACATGCAGTCATACATGATGCAC TTGCTA
***** ***** * * ***** ***** *****

P. falciparum  ATATAAATGTAATTGTTAAGATTAACATTCTTGATGAAGTAATGATAATACCTTCATTAC
P. vivax      AAATAAATGTAATAGTTAGAATTAAACATTCTTGATGATGTTAAAAATAATTCCTTCATTAT
P. malariae  AAGTAAATGTAATAGTTAAATTAACATTCTTGATGAAGTAATATAAATTCCTTCATCAT
* ***** * * * * * * * * * * * * * * * *

P. falciparum  TTAATGGATATGGTGATAAACTAAAATGTAATATACCCCAAAAATATGTAAGAATAATA
P. vivax      ATAAATGGATATGGAGATAAACTAAAATGTAATATACCCCAAAAATATGTAATAAATAATA
P. malariae  ATAAAGGACATGGAGATAAACTAAAATGTAATATACCCCAAAAATATGTAATAAATAATA
*** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

P. falciparum  AAGCTTCTGATATTATGATAGATAACATACCAGAATTAAAGATGAAAAATACAGAATAAA
P. vivax      TTGCTTCAGATATAATTATAGATAACATTCTTGATTAATGATGAAAAATATAGAATAAA
P. malariae  ATGCTTCAGATATAAATTGATAACATACCAGAACTAATGAAGAAAAATGTGGAATAAA
***** ***** * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 8 – Alinhamento do gene mitocondrial cox III das três espécies (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*). * bases comuns presentes nas três espécies. Em vermelho (*primer forward* - *P. falciparum*); em roxo (*primer reverse* – *P. falciparum*). Foram destacadas em cores as posições nucleotídicas espécie-específicas.

```

P. falciparum  AATACTACGTACTGAATTATATTCTTCATCTTTAAGAATAATTGCACAAGAAAATGTAAA
P. vivax       TATTTTACGTACAGAATTATATTCTTCTCTTTAAGAATAATTGCACAAGAAAATGTTAA
P. malariae    TATTTTACGTACTGAATTATATACTTCTTCTTTAAGAATTATAGCACAAGAAAATGTAA
                **      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

P. falciparum  TCTATATAATATGATATTTACAATTCACGGAATAATTATGATTTTTTTCAATATAATGCC
P. vivax       CTATATAATATGATATTTACATTACATGGAATTATTATGATATTCTTTAATATAATGCC
P. malariae    TTTATATAATATGATATTTACGATACATGGTATAATTATGATATTTTTCAATATAATGCC
                *****      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

P. falciparum  AGGATTATTCGGAGGATTTGGTAATTACTTTCTACCTATTTTATGTGGATCTCCAGAATT
P. vivax       AGGATTATTTGGAGGATTCGGTAATTACTTCCTACCAATTTTATGTGGTCTCCAGAACT
P. malariae    AGGATTATTTGGAGGATTTGGAAATTATTTTTACCTATTTTATGTGGATCTCCAGAAT
                *****      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

P. falciparum  AGCATATCCTAGAATTAATAGTATATCTTTACTGTTACAACCAATTGCTTTTGTTTAGT
P. vivax       TGCATATCCAAGAATTAATAGTATATCTTTATTATTACAACCAATAGCTTTTATATTAGT
P. malariae    TTCATATCCAAGAATTAATAGTATATCTTTATTATTACAACCAATTGCTTTTATATTAA
                *****      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

P. falciparum  TATATTATCTACTGCAGCAGAATTTGGTGGTGGAACTGGATGGACTTTATATCCACCATT
P. vivax       CATTTTATCTACAGCAGCAGAATTTGGAGGAGGTACTGGATGGACTTTATATCCACCATT
P. malariae    TATTTTATCTACAGCTGCTGAATTTGGAGGAGGAACAGGATGGACTTTATATCCACCATT
                **      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

P. falciparum  AAGTACATCTTTAATGTCATTATCTCCTGTAGCTGTAGATGTAATTAATTTTGGTTTATT
P. vivax       AAGTACATCACTTATGTCTTTATCTCCTGTGTCAGTAGATGTTATATTGTTGGTCTTTT
P. malariae    AAGTACTTCTCTTATGTCTTTATCTCCTGTTGCTGTAGATGTAATTATTCTTGGTCTTTT
                *****      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

```

Figura 9 – Alinhamento do gene mitocondrial cox I das três espécies (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*). * bases comuns presentes nas três espécies. Em vermelho (*primer forward* - *P. vivax*); em roxo (*primer reverse* – *P. vivax*). Foram destacadas em cores as posições nucleotídicas espécie-específicas.

```

P. falciparum  ATTATGGAGT GGATGGTGTT TTAGATACAT GCACGCAACA GGTGCTTCTC
P. vivax      ATTATGGAGT GGATGGTGTT TTAGATATAT GCATGCTACA GGTGCATCTC
P. malariae   ATTATGGAGT GGATGGTGTT TTAGATATAT GCATGCAACA GGTGCATCAC
*****
P. falciparum  TTGTATTTT  ATTAACATAT CTTCATATTT TAAGAGGATT AAATTACTCA
P. vivax      TTGTATTTT  ATTAACATAT TTACACATTT TAAGAGGATT AAATTATTCA
P. malariae   TTGTATTTT  TTAACCTTAT TTACATATTT TAAGAGGATT AAATTATTCT
*****
P. falciparum  TATATGTATT TACCATTATC ATGGATATCT GGATTGATTT TATTTATGAT
P. vivax      TATTTATATT TACCATTATC ATGGATATCA GGATTAATCA TATTTGCATT
P. malariae   TATTTATATT TACCATTATC ATGGATATCA GGATTAATTA TATTTGCATT
*** *
P. falciparum  ATTTATTGTA ACTGCTTTTG TTGGTTATGT CTTACCATGG GGTCAAATGA
P. vivax      ATTTATAGTT ACAGCTTTTA TAGGTTACGT TTTACCTTGG GGACAAATGA
P. malariae   ATTTATAGTT ACAGCTTTTA TAGGTTATGT TTTACCATGG GGACAAATGA
*****
P. falciparum  GTTATTGGGG TGCAACTGTA ATTACTAACT TGTATCCTC  TATTCCAGTA
P. vivax      GTTATTGGGG TGCAACTGTT ATAACTAATT TATTATCTC  AATTCCAGTA
P. malariae   GTTATTGGGG TGCAACAGTT ATTACTAATT TATTATCTC  AATTCCAGCA
*****
P. falciparum  GCAGTAATTT GGATATGTGG AGGATATACT GTGAGTGATC CTACAATAAA
P. vivax      TTAGTAATTT GGTATGTGG  AGGATATACT GTAAGTGATC CTACAATTAA
P. malariae   CTAGTAATTT GGTATGTGG  AGGATATACT GTAAGTGATC CAACTATAAA
** *

```

Figura 10 – Alinhamento do gene mitocondrial cytb das espécies (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*). * bases comuns presentes nas três espécies. Em vermelho (primer forward - *P. malariae*); em roxo (primer reverse – *P. malariae*). Foram destacadas em cores as posições nucleotídicas espécie-específicas.

A seguir, os seis *primers* resultantes (três pares, cada par proveniente de um gene mitocondrial) foram analisados pela ferramenta *Primer Blast*, com relação à compatibilidade e formação de *mismatches* entre eles usando o site *Multiple Primer Analyzer*

(<http://www.thermofisher.com/br/pt/home/brands/thermo-scientific/molecularbiology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermoscientific-web-tools/multiple-primeranalyzer.html#/legacy=www.thermocientificbio.com>).

Os três pares de *primers* também foram testados com relação à possibilidade de ligação ao DNA de outras espécies de *Plasmodium*, que não as espécies desejadas, e ainda

em relação a ligação ao DNA de outros microrganismos, por intermédio da ferramenta *Multiple Primer Analyzer* (Thermo Fischer Scientific).

Tabela 3 – Descrição dos *primers* usados na *multiplex*-PCR.

Alvo da PCR	Primers	PM	Referência
Região variável de cox III específica de <i>P. falciparum</i> (KM065497.1)*	F-5'-cacaataaaataatgtagtat-3' R-5'-acttctggtatgttatctatc-3'	346 pb	Este estudo
Região variável de cox I específica de <i>P. vivax</i> (AY598140.1)*	F-5'-aattgcacaagaaaatgtaact-3' R-5'-caatgataacatctact-3'	311 pb	Este estudo
Região variável de cytb específica de <i>P. malariae</i> (AB354570.1)*	F-5'-tgcatacacttgatttttc-3' R-5'-acataaccaataacaagtg-3'	226 pb	Este estudo

* Número de acesso no GenBank; F- *forward*; R- *reverse*; PM- peso molecular do amplificado; pb- pares de base. Foram destacadas em amarelo as posições nucleotídicas espécie-específicas.

5.7 DETECÇÃO DO MATERIAL AMPLIFICADO POR ELETROFORESE CAPILAR

Na presente pesquisa, para a avaliação dos produtos de amplificação, optamos pela substituição da clássica eletroforese horizontal em géis de agarose pela eletroforese capilar realizada no equipamento GelBot (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil), pelo fato desta técnica apresentar maior grau de resolução, isto é, ser capaz de discriminar produtos de amplificação diferindo em apenas 2 a 4 pares de base (pb) em análises feitas em acrilamida, além de ser mais rápida e apresentar menor custo. Resumidamente, as análises utilizaram o cartucho de alta resolução S1 e após a injeção do marcador de alinhamento MA-1, que limita o intervalo dentro do qual os fragmentos amplificados terão que estar compreendidos, no caso entre 20-1000 pb, o volume de 1 µL de amostra (amplificado) é injetado no cartucho, e a seguir é realizada a injeção de 1 µL do marcador de peso molecular (100 bp ladder). Os procedimentos foram realizados de acordo com o método M-4-2-06-300 (2 segundos de injeção da amostra a 4 kV, seguido pela etapa de separação de 300 segundos a 6kV). Os resultados foram analisados pelo programa *Q-Analyzer*, da mesma empresa.

5.8 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO (SENSIBILIDADE ANALÍTICA)

O limite de detecção (LoD) ou sensibilidade analítica é definida como a menor concentração ou quantidade do alvo de amplificação que é consistentemente detectável, isto é, pode ser detectada com segurança em 95% das amostras testadas contendo concentrações conhecidas do alvo(93,94). Esta avaliação é feita mediante o teste de replicatas destas diluições, devendo-se obter 19 detecções em um total de 20 testes para que os 95% de detecção sejam atingidos.

5.9 TESTE DE ESPECIFICIDADE DA *MULTIPLEX*-PCR

Além do teste de 47 amostras de DNA de indivíduos sadios, sabidamente não infectados, doadores de Banco de Sangue, a especificidade da *multiplex*-PCR analisou amostras de DNA pertencentes a microrganismos filogeneticamente relacionados ao *Plasmodium*, tais como *Leishmania shawi*, *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni* (e *Toxoplasma gondii*. Também foram testadas amostras de DNA de outros microrganismos causadores de infecções que cursam com anemia: *Bartonella henselae* *Babesia vogeli*, *Rickettsia vini*. Adicionalmente, foram testadas amostras de DNA de espécies de *Plasmodium* que infectam roedores e aves e não infectam o homem (*P. chabaudi* e *P. berghei* que são parasitos causadores de infecções em roedores e *P. nucleophilum*, espécie causadora de infecção aviária).

As amostras de DNA utilizadas nos testes de especificidade foram gentilmente cedidas pelos seguintes pesquisadores/laboratórios:

- a) *P. chabaudi*, *P. berghei* e *P. nucleophilum*: Dra. Karin Kirchgatter – Pesquisador científico VI da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN);
- b) *L. shawi*: Prof. Dr. Paulo Cesar Cotrim – Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo;

- c) *T. cruzi*: Dra. Lúcia Maria Almeida Braz - Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo;
- d) *T. gondii*: Prof. Heitor Franco de Andrade Júnior – Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo;
- e) *S. mansoni*: Prof. Ronaldo César Borges Gryschek e Dra. Maria Cristina Santo – Laboratório de Helminologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo;
- f) *B. henselae*, *B. vogeli* e *R. vini*: Prof. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho – Professor livre-docente da Disciplina de Dermatologia do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

5.9.1 CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*

Para a obtenção de quantidades suficientes de DNA das três espécies de malária para uso como controle positivo da *multiplex*-PCR, foram feitas clonagens dos fragmentos específicos de cada uma das três espécies de *Plasmodium* usadas nesta pesquisa (QIAGEN PCR Cloning Kit).

5.9.2 OBTENÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES *Escherichia coli*

Para obtenção de células competentes, as cepas de bactérias *E. coli* foram estriadas em placas de petri estéreis contendo ágar em meio Lúria-Bertani (LB) e incubadas durante 16 horas a 37°C. Após este período as colônias foram inoculadas em 10 mL de meio LB e mantidas sob agitação durante 16 horas. O inóculo foi diluído em 200 mL de meio LB e esta solução foi deixada sob agitação até atingir a densidade óptica ideal ($DO_{600} \sim 0,6$). A cultura foi então incubada em gelo durante 30 minutos.

O inóculo foi centrifugado a 5.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. Após esta etapa, o pellet foi ressuspenso em 5 mL de solução de CaCl₂ (100 mM) gelada. Após 15 minutos de incubação em gelo, a suspensão foi centrifugada a 5.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado e pellet foi novamente ressuspenso em solução de CaCl₂.

5.9.3 LIGAÇÃO DO INSERTO AO VETOR

A ligação do fragmento de DNA de interesse (inserto) ao vetor foi feita usando 2-3 µL (~ 40 ng) do inserto, 1 µL de enzima T4 ligase, 1 µL do vetor pDrive, 5 µL do master mix ligase, acrescentando-se água ultrapura para a obtenção de um volume final de 10 µL. A reação de ligação do inserto ao vetor foi incubada *overnight* a 16°C (QIAGEN PCR Cloning Kit).

5.9.4 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS *Escherichia coli*

Células competentes (*E. coli* cepa EZ), foram transformadas com o plasmídeo recombinante pDrive (QIAGEN PCR Cloning Kit). As células competentes foram incubadas em gelo por 30 minutos juntamente com uma alíquota de plasmídeo recombinante. Após choque térmico as células foram mantidas brevemente em gelo e ressuspensas em meio SOC (meio super ótimo com repressão de catabólitos, contendo triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM e glicose 20 mM), utilizado na etapa final da transformação de bactérias para aumentar a eficiência da mesma. Para a seleção dos clones bacterianos transformados, as células foram plaqueadas em placas de petri estéreis e descartáveis contendo meio LB-ágar contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C por 16 horas.

As colônias transformadas (coloração branca) foram deixadas em crescimento a 37°C por 16 horas em meio LB-ampicilina para a expansão dos clones positivos e posterior extração do DNA plasmidial. A cultura de bactérias saturada foi centrifugada a 12.000 x g durante 30 segundos a 4°C. Ao precipitado de bactérias foram adicionados 100 µL da

solução I (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 50 mM de glicose) gelada. Os microtubos foram agitados vigorosamente em vortex até a completa dissolução do pellet. A seguir foram deixados em banho de gelo por 5 minutos, e foram acrescentados 200 µL da solução II [0,2 N NaOH (MERCK, Germany), 1% SDS (Invitrogen, USA)] preparada extemporaneamente. Os microtubos foram homogeneizados por inversão rápida por 5 vezes, em seguida foram deixados novamente em banho de gelo por 5 minutos e 150 µL da solução III foram adicionados [3 M de KCl (Invitrogen, USA) além de solução 5 M de acetato gelada, sendo os microtubos agitados levemente em vortex. A extração foi então mantida em gelo por 5 minutos, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x *g* por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante (fase aquosa) foi recuperado. Em seguida, o DNA foi precipitado com adição, volume à volume, de 400 µL de isopropanol em temperatura ambiente. A solução foi então centrifugada a 12.000 x *g* por 15 minutos a 4°C e o precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 200 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM/EDTA 1 mM).

5.9.5 CÁLCULO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO PLASMÍDEO CONTENDO O INSERTO DAS ESPÉCIES *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*

Para efetuar o cálculo do número de cópias do plasmídeo contendo o inserto das três espécies utilizou-se o seguinte site: <https://www.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/pipet-tips/decoded/2013/10/21/calculations-converting-from-nanograms-to-copy-number>.

Número de cópias (moléculas) = $\frac{\text{X ng} \times 6,0221 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}}{(\text{N} \times 660 \text{ g/mol}) \times 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$

(N x 660 g/mol) x 1 x 10⁹ ng/g

Onde: X = massa de DNA de cada espécie

N = número de pares de bases do plasmídeo + inserto

660 g/mol = massa correspondente a um par de bases de DNA dupla fita

5.9.6 SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DA MULTIPLEX-PCR

Para a confirmação de que a *multiplex*-PCR produz amplificações específicas das três espécies de *Plasmodium* estudadas, produtos de amplificação representativos dos alvos das três espécies de plasmódio, obtidos dos controles positivos clonados e também de amostras clínicas testadas na etapa de validação do método, foram purificados com o kit comercial “GFX PCR and Gel Band” (GE Healthcare). Após a etapa de PCR foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 2% e a seguir o fragmento de DNA foi recortado do gel, colocado em microtubo eppendorf de 1,5 mL e purificado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foram acrescentados 10 µL de tampão “*Wash Buffer Type 3*” para cada 10 mg de agarose recortada do gel. A seguir, o microtubo foi deixado em banho seco a 60°C por 30 minutos para a total dissolução do gel de agarose (contendo o fragmento amplificado), em seguida a solução foi homogeneizada por inversão, incubada por 1 minuto em temperatura ambiente e transferida para uma coluna de afinidade acoplada a um microtubo, sendo a coluna centrifugada a 14.000 x g (eppendorf Centrifuge 5417R) por 30 segundos, e o sobrenadante descartado. A seguir, a coluna foi lavada com 500 µL da solução “*Wash Buffer Type 1*” e deixada em temperatura ambiente por 1 minuto, em seguida centrifugada a 14.000 x g por 30 segundos. Posteriormente, a coluna foi novamente lavada com 500 µL da solução “*Wash Buffer Type 1*” e foi realizada nova centrifugação a 14.000 x g por 30 segundos.

O DNA foi então eluído transferindo-se a coluna para um microtubo estéril, e adicionando-se 20 µL da solução “*Elution Buffer Type 6*” no centro da coluna, incubando a amostra por 1 minuto em temperatura ambiente e a seguir realizando-se centrifugação a 14.000 x g por 1 minuto. Esse procedimento foi realizado para a remoção de resíduos de sais e produtos não incorporados durante a reação de PCR.

A estimativa da massa de DNA do fragmento purificado foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, USA) a 2 % com o auxílio do reagente *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, SA). As intensidades das bandas de DNA purificadas

foram comparadas visualmente com os padrões do marcador de massa, e a massa de DNA das amostras em nanogramas foi determinada de acordo com a tabela fornecida pelo fabricante.

O sequenciamento foi realizado na plataforma ABI PRISM® 3500 *Genetic Analyzer* no laboratório de Gastroenterologia do IMT-USP. A reação propriamente dita usou o kit *Big Dye® Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, USA). Resumidamente em 20 µL de reação contendo *Mix BigDye* 1:2; 1,5 o 5 x *Sequencing Buffer* 2 µL, foram adicionados 2 µL de cada *primer* correspondendo a 3.2 µM. A reação foi realizada em termociclador nas seguintes condições: 25 ciclos de 96°C por 1 minuto, 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos. Para a retirada de produtos não incorporados durante a reação de sequenciamento foi realizada a precipitação do DNA utilizando o reagente *Big Dye® X Terminator™ Purification Kit* (Applied Biosystems, USA) seguindo as instruções descritas pelo fabricante.

Os eletroferogramas obtidos após o sequenciamento foram editados utilizando o software *BioEDIT Sequence Alignment Editor*. As sequências foram alinhadas e analisadas no programa *Codon Code Aligner*. Após a edição, as sequências foram, juntamente com as amostras positivas sequenciadas, submetidas à análise comparativa no site BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar a similaridade entre elas e com as sequências “protótipo” de cada uma das espécies de *Plasmodium* investigadas na *multiplex-PCR*. As sequências dos protótipos foram obtidas do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

5.9.7 CÁLCULO AMOSTRAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Como tínhamos a pretensão de elaborar tabelas de contingência 2 x 2 alocando a frequência de amostras positivas ou negativas nas duas situações, a saber, resultados dos testes de referência (gota espessa, semi-*nested-PCR* e *nested-PCR*) e resultados da *multiplex-PCR* proposta neste estudo, e a seguir determinar a concordância entre estas

frequências, a análise estatística aplicou o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher quando o número de casos em uma determinada categoria foi ≤ 5 . Como o teste do qui-quadrado requer um número mínimo de 30 casos para análise, assumimos este número como sendo o mínimo necessário para as análises nesta pesquisa.

Para avaliarmos a concordância entre os testes, utilizamos o coeficiente de Kappa. Os valores encontrados no teste de concordância de Kappa foram interpretados com base na classificação descrita no manual “Métodos de Investigação Epidemiológica em Doenças Transmissíveis”, OPAS/FNS/CNE⁹⁵. A classificação utilizada foi detalhada no Quadro 2.

Quadro 2 – Classificação dos valores obtidos no teste de concordância de Kappa.

Teste de concordância de Kappa	
Ruim	< 0
Fraca	0 – 0,2
Sofrível	0,21 – 0,40
Regular	0,41 – 0,60
Boa	0,61 – 0,80
Ótima	> 0,81

6 RESULTADOS

6.1 PADRONIZAÇÃO DAS TRÊS AMPLIFICAÇÕES EM SEPARADO

As concentrações de reagentes foram os primeiros parâmetros a serem definidos na *multiplex*-PCR, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros avaliados na padronização das três amplificações da *multiplex*-PCR.

PARÂMETRO	INTERVALO ESTUDADO
dNTP	200 a 800 μ M
<i>Primers</i>	0,1 a 0,8 μ M
Enzima Taq DNA polimerase	1,0 a 2,5 unidades
DNA genômico (paciente)	10 a 500 nanogramas
MgCl ₂	1,0 a 3,0 mM
Volume total de reação	25 a 50 μ L

Tabela 5 – Parâmetros definidos para a amplificação das três espécies de *Plasmodium* (em conjunto) na *multiplex*-PCR.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO ESCOLHIDA
dNTP	200 μ M
<i>Primers P. falciparum</i>	0,2 μ M
<i>Primers P. vivax</i>	0,1 μ M
<i>Primers P. malariae</i>	0,2 μ M
Enzima Taq DNA polimerase	2,5 Unidades
DNA genômico (paciente)	50 ng
MgCl ₂	3,0 mM
H ₂ O	qsp
Volume total de reação	25 μ L

6.2 PADRONIZAÇÃO DOS CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO

Em relação ao número total de ciclos de amplificação, foram testados entre 30 e 46 ciclos. Também foram testadas várias temperaturas de denaturação e de *annealing*, além de diferentes tempos para todas as etapas da amplificação (Tabela 6).

Tabela 6 – Condições de amplificação analisadas.

ETAPA	TEMPO	TEMPERATURA
Denaturação inicial	30 segundos a 15 minutos	94 ou 95 ⁰ C
Denaturação	30 segundos a 3 minutos	94 ou 95 ⁰ C
<i>Annealing</i>	30 segundos a 3 minutos	50 a 65 ⁰ C
Extensão	1 a 2 minutos	72 ⁰ C
Extensão final	3 a 10 minutos	72 ⁰ C

Após a etapa de padronização durante a qual foram testadas várias condições de amplificação, a *multiplex*-PCR foi realizada conforme as condições descritas na Tabela 7.

Tabela 7 – Condições de amplificação da *multiplex*-PCR.

ETAPA	TEMPO	TEMPERATURA	CICLOS
Denaturação inicial	15 minutos	95 ⁰ C	1
Denaturação	1 minuto	95⁰C	
<i>Annealing</i>	3 minutos	50 ⁰ C	5
Extensão	1 minuto e 30 segundos	72 ⁰ C	
Denaturação	30 segundos	95⁰C	
<i>Annealing</i>	3 minutos	50 ⁰ C	39
Extensão	1 minuto e 30 segundos	72 ⁰ C	
Extensão final	10 minutos	72 ⁰ C	1

6.3 CÁLCULO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO PLASMÍDEO CONTENDO O INSERTO

Após o cálculo do número de cópias do plasmídeo contendo o inserto obtivemos os seguintes resultados para as três espécies de *Plasmodium*:

P. falciparum = $3,16 \times 10^{10}$ cópias/ μL de DNA (do plasmídeo contendo o inserto)

P. vivax = $2,78 \times 10^{10}$ cópias/ μL de DNA (do plasmídeo contendo o inserto)

P. malariae = $1,28 \times 10^{10}$ cópias/ μL de DNA (do plasmídeo contendo o inserto)

6.4 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA (LIMITE DE DETECÇÃO) DA MULTIPLEX-PCR PARA AS TRÊS ESPÉCIES DE *Plasmodium*

Para a avaliação da sensibilidade analítica (limite de detecção) da PCR com os *primers* específicos para as três espécies de *Plasmodium*, foram realizadas diluições seriadas partindo de quantidades conhecidas dos controles positivos clonados, isto é, dos plasmídeos contendo as sequências alvo de *cox III* (*P. falciparum*), *cox I* (*P. vivax*) e *cytb* (*P. malariae*) com a finalidade de avaliar a quantidade mínima de DNA (expressa em número de cópias do plasmídeo contendo o inserto), que as três PCR seriam capazes de amplificar.

Partindo da concentração inicial de $3,16 \times 10^{10}$ cópias/ μL de *P. falciparum*; $2,78 \times 10^{10}$ cópias/ μL de *P. vivax* e $1,28 \times 10^{10}$ cópias/ μL de *P. malariae* foram feitas diluições seriadas em tampão Tris-EDTA (TE) até atingir número de cópias dentro do intervalo de 20 a 150 cópias/reacção na PCR com volume total de 25 μL , ou seja, o equivalente a 1 parasito presente no volume total de reacção. Para que os testes simulassem as mesmas condições empregadas quando se faz a avaliação das amostras de pacientes, ao DNA total do plasmídeo contendo o inserto foram adicionados 50 ng de DNA genômico de indivíduo sadio.

No caso dos três controles positivos clonados usados na *multiplex*-PCR deste estudo, os limites de detecção (sensibilidade analítica) foram: *P. falciparum* (*primers* do gene *cox III*) 22,5 cópias/reação; *P. vivax* (*primers* do gene *cox I*) 28,7 cópias/reação e *P. malariae* (*primers* do gene *cytb*) 32 cópias/reação. Considerando que os três genes mitocondriais possuem entre 20-150 cópias por parasito, deduz-se que o limite de detecção dos três alvos da *multiplex*-PCR é de 1 parasito/reação.

6.5 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DA MULTIPLEX-PCR

Todas amostras contendo patógenos filogeneticamente aparentados ou que causam infecções que cursam com anemia foram negativas pela *multiplex*-PCR. Em relação às amostras de DNA de espécies de *Plasmodium* que infectam roedores e aves e não infectam o homem, *Plasmodium chabaudi* e *Plasmodium berghei* que são parasitos causadores de infecções em roedores e *Plasmodium nucleophilum*, espécie causadora de infecção aviária, os resultados também foram todos negativos (Figura 11).

Desta forma, todos os testes de especificidade realizados não revelaram reações cruzadas, conferindo à *multiplex*-PCR, uma especificidade de 100%.

Figura 11 – Representação em gel (poliacrilamida) dos produtos de amplificação detectados por eletroforese capilar. Observa-se que não houve amplificação para *P. chabaudi*, *P. berghei* e *P. nucleophilum* (marron, lilás e verde escuro), bem como nos controles negativos da sala de reagentes e de extração (azul escuro e verde claro); observamos amplificação apenas nos três controles positivos da reação *P. falciparum* (346bp), *P. vivax* (311bp) e *P. malariae* (226 bp) (vermelho, rosa e verde). MA – marcadores de alinhamento (20 e 1000 bp). C+ controle positivo.

6.6 SEQUENCIAMENTO DOS TRÊS CONTROLES POSITIVOS CLONADOS UTILIZADOS NA MULTIPLEX-PCR

Os produtos de amplificação gerados pelos três controles positivos clonados (*P. falciparum*, *P. vivax*, e *P. malariae*) foram sequenciados para confirmação da especificidade da *multiplex*-PCR e a seguir as sequências dos controles positivos clonados foram alinhadas e comparadas a outras sequências protótipo obtidas no GenBank, com posterior análise de similaridade utilizando o BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Observamos grau de similaridade de 99% entre o *P. falciparum* sequenciado (plasmídio contendo o inserto) e as sequências protótipo do GenBank; de 100% para *P. vivax* e de 96% para *P. malariae*, conforme representado nas figuras 12, 13 e 14, respectivamente, confirmando que a *multiplex*-PCR desenvolvida neste estudo realmente amplifica de forma específica as três espécies pretendidas.

Figura 12 – Eletroferogramas gerados das fitas *sense* (A) e *antisense* (B) da amplificação de fragmento do gene *cox III* específico de *P. falciparum*. A seguir, análise resultante do programa BLAST (C), onde *query* (seta vermelha) corresponde à sequência de nucleotídeos no formato FASTA gerados pelo sequenciamento do protótipo e *subject* (seta preta) corresponde à sequência obtida no estudo, que deve ser comparada ao protótipo, indicando 99% de similaridade (C) entre as duas sequências, e em (D) a localização das sequências no gene *cox III*.

Figura 13 – Eletroferogramas gerados das fitas *sense* (A) e *antisense* (B) da amplificação de fragmento do gene *cox I* específico de *P. vivax*. A seguir, análise resultante do programa BLAST (C), onde *query* (seta vermelha) corresponde à sequência de nucleotídeos no formato FASTA gerados pelo sequenciamento do protótipo e *subject* (seta preta) corresponde à sequência obtida no estudo, que deve ser comparada ao protótipo, indicando 100% de similaridade (C) entre as sequências, e em (D) a localização das sequências no gene *cox I*.

Figura 14 – Eletroferogramas gerados das fitas *sense* (A) e *antisense* (B) da amplificação de fragmento do gene *cytb* específico de *P. malariae*. A seguir, análise resultante do programa BLAST (C), onde *query* (seta vermelha) corresponde à sequência de nucleotídeos no formato FASTA gerados pelo sequenciamento do protótipo e *subject* (seta preta) corresponde à sequência obtida no estudo, que deve ser comparada ao protótipo, indicando 96% de similaridade (C) entre as sequências, e em (D) a localização das sequências no gene *cytb*.

6.7 RESULTADOS DAS AMOSTRAS DE PACIENTES ANALISADAS PELOS TESTES DE REFERÊNCIA

No presente estudo foram analisadas 104 amostras de DNA extraídas do sangue total de indivíduos com diagnóstico de malária, tendo sido 49 positivas para *P. falciparum*, 38 para *P. vivax*, 6 para *P. malariae*, 4 infecções mistas *P. falciparum*/*P. vivax* e 7 amostras negativas pela gota espessa. Todas as amostras foram positivas pelos testes

moleculares usados como referência: *semi-nested-PCR*⁸⁷, *nested-PCR*⁶¹ e Real Time PCR⁸⁸.

6.8 RESULTADOS DA *MULTIPLEX-PCR* EM RELAÇÃO À GOTA ESPESSA

Do total 104 amostras de pacientes com malária analisados no estudo, 60 tinham resultado de gota espessa (teste realizado por microscopistas dos laboratórios da região de Peixoto de Azevedo – MT nos estudos antigos, e por microscopistas da região de Cruzeiro do Sul, Acre, no estudo recente) disponível em nosso banco de dados, além dos resultados de *semi-nested-PCR* segundo Kimura *et al.*⁸⁷ (snPCR-K). Seis amostras tinham resultado de gota espessa e de *nested-PCR* segundo Snounou *et al.*⁵⁹ (amostras cedidas pela Dra. Sílvia Di Santi) e 38 amostras tinham resultado de gota espessa e de Real Time PCR segundo Gonçalves *et al.*⁸⁸ (amostras cedidas pelo Prof. Marcelo Urbano Ferreira).

Ao compararmos os resultados da *multiplex-PCR* com os resultados prévios de GE verificamos que, do total de 104 amostras, 97 (93,3%) foram positivas pela GE, enquanto que pela *multiplex-PCR*, todas as 104 amostras foram positivas, tendo a gota espessa produzido 7 resultados falso-negativos uma vez que as amplificações realizadas por *semi-nested-PCR*, *nested-PCR* ou Real Time PCR também foram positivas.

Na Tabela 8 apresentamos a comparação entre resultados da gota espessa e da *multiplex-PCR* em relação às espécies de *Plasmodium* detectadas.

Tabela 8 – Comparação dos resultados das espécies de *Plasmodium* detectadas pela gota espessa e pela *multiplex*-PCR.

Gota espessa		<i>Multiplex</i> -PCR							
Espécie	N	<i>Pf</i>	<i>Pv</i>	<i>Pm</i>	<i>Pf/Pv</i>	<i>Pf/Pm</i>	<i>Pv/Pm</i>	Neg	Total
<i>Pf</i>	49	43	2	0	3	1	0	0	49
<i>Pv</i>	38	2	31	1	3	0	1	0	38
<i>Pm</i>	6	0	0	6	0	0	0	0	6
<i>Pf/Pv</i>	4	0	4	0	0	0	0	0	4
Neg	7	0	6	1	0	0	0	0	7
Total	104	45	43	8	6	1	1	0	104

N= número de amostras; *Pf* – *Plasmodium falciparum*; *Pv* – *Plasmodium vivax*; *Pm* – *Plasmodium malariae*; *Pf/Pv* – infecção mista *Plasmodium falciparum*/*P. vivax*; *Pf/Pm* – infecção mista *Plasmodium falciparum*/*Plasmodium malariae*; Neg – negativo. Em negrito os resultados discordantes entre a gota espessa e a *multiplex*-PCR.

Das 49 amostras identificadas como *Pf* pela gota espessa, 43 (87,8%) foram concordantes com a *multiplex*-PCR. No entanto, 6 amostras tiveram resultados discordantes (12,2%): 2 foram identificadas pela *multiplex*-PCR como *Pv*, 3 foram identificadas como infecção mista por *Pf/Pv* e 1 amostra foi identificada como infecção mista *Pf/Pm* pela *multiplex*-PCR.

Das 38 amostras identificadas como *Pv* pela gota espessa, 31 (81,6%) foram concordantes com a *multiplex*-PCR. No entanto, 7 amostras tiveram resultados discordantes (18,4%): 2 foram identificadas como *Pf*, 1 como *Pm*, 3 infecções mistas por *Pf/Pv* e 1 identificada como infecção mista *Pv/Pm* pela *multiplex*-PCR.

Das 6 amostras identificadas como *Pm* pela gota espessa, todas foram concordantes com a *multiplex*-PCR.

Das 4 amostras identificadas como infecção mista *Pf/Pv* pela gota espessa, todas foram positivas apenas para *Pv* na *multiplex*-PCR, portanto discordando da gota espessa.

Das 7 amostras negativas na gota espessa, todas foram positivas na *multiplex*-PCR, 6 identificadas com *Pv* e 1 amostra como *Pm*, conforme apresentado na Tabela 8.

Considerando o total de 104 amostras, houve discordância entre os resultados da gota espessa e da *multiplex*-PCR em 24 amostras (24/104 ou 23%).

Devido às diferenças entre as técnicas de *semi-nested*-PCR, *nested*-PCR e Real Time PCR, os resultados das comparações destas técnicas com a *multiplex*-PCR foram apresentados separadamente nas Tabelas 9, 10, e 11 respectivamente.

6.9 RESULTADOS DA SEMI-NESTED-PCR EM RELAÇÃO A MULTIPLEX-PCR

Tabela 9 – Comparação dos resultados das espécies de *Plasmodium* detectadas pela semi-nested-PCR e pela multiplex-PCR.

Semi-nested-PCR (snPCR-K)		Multiplex-PCR							Total
Espécie	N	<i>Pf</i>	<i>Pv</i>	<i>Pm</i>	<i>Pf/Pv</i>	<i>Pf/Pm</i>	<i>Pv/Pm</i>	<i>Pf/Pv/Pm</i>	
<i>Pf</i>	25	24	0	0	1	0	0	0	25
<i>Pv</i>	9	0	9	0	0	0	0	0	9
<i>Pm</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pf/Pv</i>	14	1	9	0	4	0	0	0	14
<i>Pf/Pm</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Pv/Pm</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Pf/Pv/Pm</i>	10	3	4	2	1	0	0	0	10
Total	60	28	22	2	6	1	1	0	60

N= número de amostras; *Pf* – *Plasmodium falciparum*; *Pv* – *Plasmodium vivax*; *Pm* – *Plasmodium malariae*; *Pf/Pv* – Infecção mista *Plasmodium falciparum*/*P. vivax*; *Pf/Pm* – infecção mista *Plasmodium falciparum*/*Plasmodium malariae*. Em negrito os resultados discordantes entre a semi-nested-PCR e a multiplex-PCR.

Sessenta amostras foram testadas pela snPCR-K e pela multiplex-PCR. Das 25 amostras identificadas como *Pf* por snPCR-K, 24 (96%) foram concordantes com a multiplex-PCR e 1 amostra foi discordante (4%) e identificada como infecção mista *Pf/Pv* pela multiplex-PCR.

Das nove amostras identificadas como *Pv* na snPCR-K, todas (100%) foram concordantes com a multiplex-PCR.

Das 14 amostras identificadas como infecção mista *Pf/Pv* por snPCR-K, 4 (28,6%) foram concordantes com a *multiplex*-PCR (identificação de infecção mista) e 10 (71,4%) foram discordantes: 1 amostra foi identificada apenas como *Pf* pela *multiplex*-PCR e 9 amostras foram identificadas apenas como *Pv* pela *multiplex*-PCR.

A amostra identificada como infecção mista por *Pf/Pm* e a amostra identificada como infecção mista *Pv/Pm* por snPCR-K tiveram resultados concordantes com a *multiplex*-PCR.

Todas as 10 amostras identificadas como tripla infecção *Pf/Pv/Pm* pela snPCR-K apresentaram resultados discordantes pela *multiplex*-PCR: 3 amostras foram identificadas apenas como *Pf*, 4 amostras apenas como *Pv*, 2 amostras apenas como *Pm* e 1 amostra como infecção mista *Pf/Pv* em lugar de tripla infecção.

Resumidamente, quando compararmos o resultado da snPCR-K com a *multiplex*-PCR, houve 100% de concordância entre as técnicas em termos de detecção de casos positivos 60/60 (100%) se considerarmos como concordância apenas a positividade ou negatividade das amostras para quaisquer das espécies, porém houve discordância na identificação da espécie de *Plasmodium* nas infecções mistas em 21 casos do total de 60 casos (21/60 ou 35%).

6.9.1 RESULTADOS DA *NESTED*-PCR EM RELAÇÃO A *MULTIPLEX*-PCR

Tabela 10 – Comparação dos resultados de determinação da espécie de *Plasmodium* obtidos pela *nested*-PCR e pela *multiplex*-PCR.

<i>Nested</i> -PCR*		<i>Multiplex</i> -PCR							
Espécie	N	<i>Pf</i>	<i>Pv</i>	<i>Pm</i>	<i>Pf/Pv</i>	<i>Pf/Pm</i>	<i>Pv/Pm</i>	<i>Pf/Pv/Pm</i>	Total
<i>Pm</i>	6	0	0	6	0	0	0	0	6
Total	6	0	0	6	0	0	0	0	6

N= número de amostras; *Pf* – *Plasmodium falciparum*; *Pv* – *Plasmodium vivax*; *Pm* – *Plasmodium malariae*; *Pf/Pv* – infecção mista *Plasmodium falciparum*/*P. vivax*; *Pf/Pm* – infecção mista *Plasmodium falciparum*/*Plasmodium malariae*; *Pv/Pm* – infecção mista *Plasmodium vivax*/*Plasmodium malariae*; *Pf/Pv/Pm* – infecção mista *Plasmodium falciparum*/*Plasmodium vivax*/*Plasmodium malariae*; Protocolo de *nested*-PCR de acordo *Snounou *et al.*, 1993⁵⁹.

Das 6 amostras detectadas como *Pm* na *nested*-PCR, houve concordância de (100%) com a *multiplex*-PCR uma vez que todas também foram positivas apenas para *Pm*, conforme a Tabela 10.

6.9.2 RESULTADOS DA REAL TIME PCR (*SYBR Green*) EM RELAÇÃO A *MULTIPLEX-PCR*

Tabela 11 – Comparação dos resultados de determinação da espécie de *Plasmodium* obtidos pela Real Time PCR (*SYBR Green*) e pela *multiplex-PCR*.

Real Time PCR*		<i>Multiplex-PCR</i>							
Espécie	N	<i>Pf</i>	<i>Pv</i>	<i>Pm</i>	<i>Pf/Pv</i>	<i>Pf/Pm</i>	<i>Pv/Pm</i>	<i>Pf/Pv/Pm</i>	Total
<i>Pf</i>	17	17	0	0	0	0	0	0	17
<i>Pv</i>	21	0	21	0	0	0	0	0	21
Total	38	17	21	0	0	0	0	0	38

N= número de amostras; *Pf* – *Plasmodium falciparum*; *Pv* – *Plasmodium vivax*; *Pm* – *Plasmodium malariae*; *Pf/Pv* – infecção mista *Plasmodium falciparum*/*P. vivax*; *Pf/Pm* – infecção mista *Plasmodium falciparum*/*Plasmodium malariae*; *Pv/Pm* – infecção mista *Plasmodium vivax*/*Plasmodium malariae*; *Pf/Pv/Pm* – infecção mista *Plasmodium falciparum*/*Plasmodium vivax*/*Plasmodium malariae*; Protocolo de Real Time PCR de acordo * Gonçalves *et al.*, 2012¹⁰⁰.

Das 17 amostras detectadas como *Pf* e das 21 amostras detectados como *Pv* por Real Time PCR, houve concordância de 100% com a *multiplex-PCR*, conforme a Tabela 11.

Nas tabelas 12, 13, 14 apresentamos os resultados do teste de concordância (coeficiente de Kappa) realizado na detecção das espécies *falciparum*, *vivax* e *malariae* pela *multiplex-PCR* e pela gota espessa.

Tabela 12 – Coeficiente de Kappa na detecção da espécie *P. falciparum* pela *multiplex*-PCR e pela gota espessa.

<i>Plasmodium falciparum</i>			
Gota espessa	<i>Multiplex</i> -PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	47	6	53
Negativo	5	46	51
Total	52	52	104

$p < 0,0001$ (teste exato de Fisher); coeficiente de Kappa = 0,788

Tabela 13 – Coeficiente de Kappa na detecção da espécie *P. vivax* pela *multiplex*-PCR e pela gota espessa.

<i>Plasmodium vivax</i>			
Gota espessa	<i>Multiplex</i> -PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	39	2	41
Negativo	6	57	63
Total	45	59	104

$p < 0,0001$ (teste exato de Fisher); coeficiente de Kappa = 0,842.

Tabela 14 – Coeficiente de Kappa na detecção da espécie *P. malariae* pela *multiplex*-PCR e pela gota espessa.

<i>Plasmodium malariae</i>			
Gota espessa	<i>Multiplex</i> -PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	6	0	6
Negativo	3	95	98
Total	9	95	104

$p < 0,0001$ (teste exato de Fisher); coeficiente de Kappa = 0,785.

Observamos que houve uma boa concordância entre a *multiplex*-PCR e a gota espessa na identificação da espécie *P. falciparum* (Kappa 0,788, Tabela 12). Em relação a identificação de *P. vivax*, a concordância entre os testes foi ótima (Kappa 0,842, Tabela 13), e para a identificação de *P. malariae* a concordância entre gota e *multiplex*-PCR foi boa (Kappa 0,785, Tabela 14).

Nas tabelas 15, 16, 17 apresentamos os resultados do teste de concordância (coeficiente de Kappa) entre a *multiplex*-PCR e a *semi-nested*-PCR na detecção das espécies *falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, respectivamente.

Tabela 15 – Coeficiente de Kappa na detecção da espécie *P. falciparum* pela *multiplex*-PCR e pela *semi-nested*-PCR.

<i>Plasmodium faciparum</i>			
Semi-nested-PCR	<i>Multiplex</i> -PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	35	15	50
Negativo	0	10	10
Total	35	25	60

$p < 0.0001$ (teste exato de Fisher); coeficiente de Kappa = 0,437

Tabela 16 – Coeficiente de Kappa na detecção da espécie *P. vivax* pela *multiplex*-PCR e pela *semi-nested*-PCR.

<i>Plasmodium vivax</i>			
Semi-nested-PCR	<i>Multiplex</i> -PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	28	6	34
Negativo	1	25	26
Total	29	31	60

$p < 0.0001$ (teste exato de Fisher); coeficiente de Kappa = 0,768

Tabela 17 – Coeficiente de Kappa na detecção da espécie *P. malariae* pela *multiplex*-PCR e pela *semi-nested*-PCR.

<i>Plasmodium malariae</i>			
Semi-nested-PCR	<i>Multiplex</i> -PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	4	8	12
Negativo	0	48	48
Total	4	56	60

$p = 0,0011$ (teste exato de Fisher); coeficiente de Kappa = 0,444

Observamos que houve uma concordância regular entre a *multiplex*-PCR e a snPCR-K na identificação da espécie *P. falciparum* (Kappa 0,437, Tabela 15), uma boa concordância para *P. vivax* (Kappa 0,768, Tabela 16) e uma concordância regular para a identificação de *P. malariae* (Kappa 0,444, Tabela 17).

6.9.3 ELETROFORESE CAPILAR DE AMOSTRAS CLÍNICAS COM INFECÇÃO POR *Plasmodium*.

Nas Figuras 15 e 16, apresentamos resultados da *multiplex*-PCR após eletroforese capilar, de dois casos com infecções mistas.

Figura 15 – Eletroforese capilar: representação em eletroferograma (A) e em gel de poliacrilamida (B) de um caso de infecção mista por *P. vivax* (325 bp) e *P. falciparum* (356 bp). Setas verdes indicam os marcadores de alinhamento (20 e 1000 bp).

Figura 16 – Eletroforese capilar: representação em eletroferograma (A) e em gel de poliacrilamida (B) de um caso de infecção mista por *P. malariae* (235 bp) e *P. vivax* (324 bp). Setas verdes indicam os marcadores de alinhamento (20 e 1000 bp).

Na figura 15, é possível identificar duas amplificações, sendo uma amplificação com 325 bp correspondendo a *P. vivax* e outra com 356 bp correspondendo a *P. falciparum*. Em relação ao alinhamento de sequências das cepas protótipo, realizado para o delineamento dos *primers* espécie-específicos, houve variação de 2 bp no peso molecular dos amplificadores de *P. vivax* (entre 324 a 326 bp), sendo que o previsto deveria ter 311 bp (15 bp de diferença). Da mesma forma, ainda na figura 15, houve uma amplificação de *P. falciparum* com 356 bp. Dentre as amostras clínicas o amplificado de *P. falciparum* apresentou variação entre 353 a 356 bp (3 bp), sendo o previsto de 346 bp (10 bp de diferença em relação ao peso molecular previsto).

Na figura 16, é possível verificar duas amplificações, sendo uma amplificação de *P. vivax* com 324 bp, sendo o peso molecular previsto de 311 bp, e no estudo a variação foi de 2 bp (entre 324 e 326 bp), enquanto para *P. malariae* houve uma variação de apenas 1 bp (entre 235 e 236) no estudo, sendo o peso molecular previsto de 226 bp (9 bp de diferença em relação ao peso molecular previsto).

6.9.4 SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE ALGUMAS AMOSTRAS CLÍNICAS DO ESTUDO

Um produto de amplificação de cada espécie (*falciparum*, *vivax*, e *malariae*) obtido a partir da análise de amostras de DNA de pacientes com malária foi selecionado ao acaso e sequenciado para confirmação dos resultados da *multiplex*-PCR, seguindo os mesmos passos já descritos anteriormente, realizando o alinhamento das sequências dos pacientes em relação às daquelas dos protótipos obtidos no GenBank e posterior análise de similaridade por meio do BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Observamos grau de similaridade de 99% entre o *P. falciparum* sequenciado da amostra de paciente e as sequências protótipo do GenBank; de 99% para *P. vivax* e de 99 % para *P. malariae*, conforme representado nas figuras 17, 18 e 19, respectivamente, confirmando que a *multiplex*-PCR desenvolvida neste estudo realmente amplifica de forma específica *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*.

Figura 17 – Eletroferogramas gerados das fitas *sense* (A) e *antisense* (B) da amplificação de fragmento do gene *cox III* de *P. falciparum* de uma amostra de paciente. A seguir, análise resultante do programa BLAST (C), onde *query* (seta vermelha) corresponde à sequência de nucleotídeos no formato FASTA gerados pelo sequenciamento do protótipo e *subject* (seta preta) corresponde à sequência obtida no estudo, que deve ser comparada ao protótipo, indicando 99% de similaridade (C). Em (D) a localização das sequências no gene *cox III*.

Figura 18 – Eletroferogramas gerados das fitas *sense* (A) e *antisense* (B) da amplificação de fragmento do gene *cox I* de *P. vivax* de uma amostra de paciente. A seguir, análise resultante do programa BLAST (C), onde *query* (seta vermelha) corresponde à sequência de nucleotídeos no formato FASTA gerados pelo sequenciamento do protótipo e *subject* (seta preta) corresponde à sequência obtida no estudo, que deve ser comparada ao protótipo, indicando 99% de similaridade (C). Em (D) a localização das sequências no gene *cox I*.

Figura 19 – Eletroferogramas gerados das fitas *sense* (A) e *antisense* (B) da amplificação de fragmento do gene *cytb* de *P. malariae* de uma amostra de paciente. A seguir, análise resultante do programa BLAST (C), onde *query* (seta vermelha) corresponde à sequência de nucleotídeos no formato FASTA gerados pelo sequenciamento do protótipo e *subject* (seta preta) corresponde à sequência obtida no estudo, que deve ser comparada ao protótipo, indicando 96% de similaridade (C). Em (D) a localização das sequências no gene *cytb*.

6.9.5 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DAS AMOSTRAS DE DOADORES DE BANCO DE SANGUE OBTIDOS POR SEMI-NESTED-PCR (snPCR-K) E PELA MULTIPLEX-PCR

Das 47 amostras de doadores de banco de sangue (Hemocentro de São Paulo) com resultado negativo pela semi-nested-PCR, todas também apresentaram resultados negativos pela *multiplex*-PCR, havendo concordância de 100% entre as duas técnicas. Na Figura 20 apresentamos os resultados da eletroforese capilar de sete amostras de banco de sangue.

Figura 20 – Representação em gel (poliacrilamida) dos produtos de amplificação detectados por eletroforese capilar. Observa-se que não houve amplificação nas sete amostras de banco de sangue (BS). Observamos amplificação apenas nos três controles positivos da reação *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (vermelho, roxo e verde). MA – marcadores de alinhamento (20 e 1000 bp). C+ controle positivo.

7 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, várias iniciativas para erradicar a malária resultaram em declínio global da morbimortalidade atribuída a doença. A Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou redução de 29% nas taxas de mortalidade por malária desde 2010, entretanto a malária continua sendo um grave problema de saúde global^{79,96,97}, necessitando ainda de esforços significativos para que as metas da OMS que visam a redução da incidência e da mortalidade da malária em 90% ou mais até 203^(97,98) sejam atingidas. O aperfeiçoamento dos métodos diagnósticos é ainda mais relevante quando consideramos que o número de casos de malária no Brasil e no mundo aumentou de 2016 para 2017, interrompendo a queda que vinha ocorrendo.

Atualmente, a OMS recomenda que o manejo de casos seja guiado pela detecção de parasitos ou de antígenos de *Plasmodium* em sangue periférico de pacientes febris, assim como de portadores assintomáticos. No entanto, as técnicas atualmente disponíveis, incluindo a microscopia (teste da gota espessa) e os testes de diagnóstico rápido (RDTs), não apresentam sensibilidade satisfatória por não serem capazes de detectar casos com baixas parasitemias⁹⁶.

Embora a microscopia apresente sensibilidade relativamente alta dependendo da experiência do manipulador, quantifique a densidade parasitária, permitindo ainda a identificação do estágio parasitário e a diferenciação de espécies, esse método é trabalhoso e requer microscopistas experientes⁶⁵. No entanto, a microscopia é o padrão ouro para o diagnóstico de malária devido ao desempenho adequado em infecções sintomáticas, porém possui limitações especialmente em regiões de baixa endemicidade, nas quais existem muitos casos assintomáticos com parasitemias muito baixas⁹⁹.

Ao longo dos anos, as ferramentas laboratoriais de diagnóstico da malária foram sendo aperfeiçoadas, e até mesmo modificações do exame microscópico convencional no qual esfregaços de sangue periférico de indivíduos suspeitos são corados (Giemsa) foram propostas, como a microscopia realizada em creme leucocitário (*buffy coat* ou QBC)⁹⁷.

O Programa Nacional de Controle de Malária utiliza atualmente para diagnóstico o SD-BIOLINE MALARIA AG Pf/Pf/Pv (ABBOTT), teste combinado que trabalha com a HRP-II e pLDH de *P. falciparum* e pLDH de *P. vivax*. O teste apresenta sensibilidade para a detecção de HRP-II de *P. falciparum* de 100% e para pLDH também de *P. falciparum* de 99,7%, enquanto que para a detecção de pLDH de *P. vivax*, a sensibilidade é de 98,2%, com especificidade de detecção dos três antígenos de 99,3%¹⁰⁷.

Métodos de diagnóstico molecular, tais como a PCR e suas variantes (*nested* e *semi-nested*-PCR), qPCR (técnica quantitativa também chamada de *Real-Time PCR* ou Real Time PCR) e a amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) começaram a ser testados no contexto da malária. As diferentes ferramentas diagnósticas descritas para a malária, cada qual com vantagens e limitações, desempenham papel importante na realização de um diagnóstico preciso⁹⁸.

Uma peculiaridade das infecções por *P. vivax*, e de forma ainda mais marcante por *P. malariae*, é a baixa densidade parasitária em sangue periférico, em comparação às infecções causadas por *P. falciparum*. Sendo assim, a identificação de indivíduos infectados assintomáticos em regiões endêmicas requer a utilização de testes diagnósticos com alta sensibilidade, capazes de aprimorar o diagnóstico laboratorial em locais com recursos limitados⁹⁶.

Existe consenso na literatura de que os testes moleculares, geralmente baseados na PCR, são mais sensíveis e específicos que a gota espessa⁶⁹, mas a sensibilidade e especificidade das amplificações dependem, em grande parte, do gene alvo selecionado.

A utilização dos genes mitocondriais de *Plasmodium sp* como alvo de amplificações permitiria, em teoria, a detecção de menores densidades parasitárias, uma vez que os genes mitocondriais estão presentes em número de cópias muito superior em cada parasito, variando de 20-150 cópias por parasito¹⁰⁰, em relação ao número de cópias do alvo molecular mais frequentemente utilizado, o 18S rRNA, presente em 4-8 cópias por parasito^{49,100}.

Na análise de Gonçalves *et al.*⁸⁸ os autores assumiram que cada genoma de *P. falciparum* e *P. vivax* contém 5 cópias do gene 18S rRNA, de acordo com o que foi

encontrado no genoma da cepa 3D7 de *P. falciparum*, mas até 8 cópias já foram estimadas para o genoma da cepa K1 de *P. falciparum*. Tal variação intraespecífica pode levar à subestimação da densidade parasitária determinada pela microscopia (gota espessa) e superestimação quando a parasitemia é determinada por Real Time PCR.

Alguns autores têm relatado trabalhos utilizando ferramentas de diagnóstico molecular tendo como alvo os genes mitocondriais para a detecção de *Plasmodium* e a identificação de espécies^{68,78,79}. Nos parasitos da malária, o genoma mitocondrial é de particular relevância, devido ao seu pequeno tamanho (~ 6 kb) e o fato de conter apenas 3 genes que codificam a enzima citocromo c oxidase I (cox I), a citocromo c oxidase III (cox III) e a citocromo b (cytb)⁴⁷.

Na presente pesquisa, decidimos desenvolver uma amplificação do tipo *multiplex* tendo como alvo os três genes mitocondriais cox III, cox I e cytb para a detecção e identificação de infecções causadas por *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, respectivamente, devendo o teste ser também capaz de detectar infecções mistas causadas por duas ou até mesmo pelas três espécies, após uma única etapa de amplificação. Esta amplificação do tipo *multiplex* deveria ser, na pior das hipóteses, tão sensível e específica quanto a *semi-nested* PCR⁸⁷ e a *nested*-PCR⁵⁹, amplamente utilizadas nas pesquisas sobre malária, permitindo ainda a definição da espécie de *Plasmodium* que causou a infecção, após uma única etapa de amplificação. Ao mesmo tempo, o emprego desta técnica *multiplex* minimizaria os riscos de contaminação cruzada entre amostras, ou de contaminação com o DNA amplificado na primeira etapa de amplificação, sendo levado para a segunda etapa de amplificação (*carry over*) que pode ocorrer na *nested*-PCR. Além disso, no procedimento que foi proposto na presente pesquisa, houve minimização dos riscos inerentes à exposição dos manipuladores a substâncias nocivas à saúde, tais como o brometo de etídeo, utilizado para revelar a presença de fragmentos de DNA amplificados após a eletroforese em géis de agarose, uma vez que foi utilizada a eletroforese capilar na qual o manipulador não é exposto ao brometo de etídeo, propiciando ainda redução do tempo de análise uma vez que a *multiplex*-PCR proposta pode ser completada em quatro horas, enquanto a *semi-nested* e a *nested*-PCR demandam no mínimo 7 horas¹⁰¹.

É preciso lembrar que a *multiplex*-PCR desenvolvida nesta pesquisa utilizou a eletroforese capilar como método de detecção em substituição à eletroforese horizontal em géis de agarose, e a eletroforese capilar pode, após fase de padronização, ser utilizada de forma semi-quantitativa, isto é, com quantidade de material amplificado (que corresponde ao número de cópias do alvo de amplificação) estimada pela área sob a curva (área formada pelo pico de amplificação). Não menos importante é a redução dos custos do teste devido à utilização de menos reagentes, substituição da eletroforese em géis de agarose pela eletroforese capilar, mais barata e muito mais rápida que a convencional, menos horas de trabalho do manipulador, com redução do tempo de uso de equipamentos. Outra vantagem, é que como vários fragmentos podem ser amplificados simultaneamente, há necessidade de quantidade menor de DNA para se chegar ao diagnóstico e determinação da espécie infectante, e a quantidade de DNA disponível para análise pode, eventualmente, ser um fator limitante¹⁰².

A *multiplex*-PCR proposta neste estudo também foi comparada à Real Time PCR realizada com *SYBR Green* e *primers* da segunda etapa de amplificação para a detecção das espécies *falciparum* e *vivax*⁸⁸, com equivalência das duas técnicas. Muito embora a Real Time PCR deva ser mais rápida que a *multiplex*-PCR no que se refere à liberação de resultados, ela requer utilização de maiores volumes de DNA das amostras pelo fato de cada espécie ter que ser detectada em reação realizada em separado, e apresenta custo mais elevado, não tendo sido testada para a detecção da espécie *malariae* pelos pesquisadores que nos cederam as amostras.

Na proposta inicial deste estudo, pretendíamos utilizar apenas um gene alvo mitocondrial, o citocromo b (cytb), delineando um par de *primers* para a amplificação do gênero *Plasmodium*, além de outros três pares de *primers* para a identificação das três espécies mais prevalentes no Brasil, *falciparum*, *vivax* e *malariae*. Um quinto par de *primers* amplificaria um fragmento de um gene constitutivo humano, a beta-actina. No entanto, a sequência nucleotídica do citocromo b possui apenas 1.200 pares de base e, devido à elevada similaridade do cytb das três espécies de *Plasmodium*, os pares de *primers* selecionados não se mostraram específicos para apenas uma das espécies, resultando desta forma em ampliações inespecíficas.

O fato de testarmos DNA genômico humano que no caso de pacientes com malária contém quantidades variáveis de DNA de *Plasmodium*, porém sempre em quantidade inferior àquela do DNA humano, fez com que os *primers* da beta-actina encontrassem muito mais alvos para se ligarem em relação aos pares de *primers* específicos para as espécies de *Plasmodium*, dificultando a padronização. Além disso, o genoma humano possui 55% de nucleotídeos CG enquanto esta porcentagem é muito mais baixa, de cerca de 30% no *Plasmodium*^{43,44,103}, fazendo com que as temperaturas de *annealing* ideais para o bom funcionamento dos pares de *primers* que deveriam amplificar o gênero *Plasmodium* e as espécies *falciparum*, *vivax* e *malariae* fossem muito mais baixas que aquela calculada para a amplificação do fragmento de beta-actina, resultando no aparecimento de várias bandas de beta-actina em lugar de uma única. Tentamos contornar o problema excluindo o par de *primers* da beta actina humana, com melhora global da reação, porém sem resolução do problema pois os *primers* que deveriam amplificar o gênero *Plasmodium*, selecionados em regiões bem conservadas do *cytb*, possuíam temperatura estimada de *melting* inferior em relação aos pares de *primer* espécie-específicos, fazendo com que também funcionassem muito melhor que os outros pares de *primer*, isto é, em temperaturas mais baixas, resultando por vezes em mais de um fragmento amplificado, ou não produzindo amplificados em temperaturas mais elevadas, ou seja, naquelas mais adequadas aos *primers* espécie-específicos.

Finalmente, após revisão detalhada das sequências nucleotídicas que correspondem aos três genes mitocondriais e confirmação de que o grau de similaridade entre as sequências das diferentes espécies é muito elevado, variando de 84 a 99%⁴², optamos pela utilização dos três genes mitocondriais (*cox III*, *cox I* e *cytb*) para a seleção de novos pares de *primers* que deveriam amplificar as três espécies, *falciparum*, *vivax* e *malariae*. Desta feita, em lugar dos *softwares* que selecionam *primers* (Primer3), decidimos realizar o alinhamento das sequências correspondendo aos três genes mitocondriais de *Plasmodium falciparum*, *vivax* e *malariae* e a seguir realizar a seleção manual dos *primers*, seguindo os preceitos preconizados para a PCR do tipo ASO (Allele Specific Oligonucleotide), que como já foi mencionado, constitui estratégia muito

utilizada em estudos genéticos para a identificação de alelos mutados, de forma específica⁹¹.

Após os testes dos três novos pares de *primers* oriundos dos três genes mitocondriais realizados com cada par em separado, e a seguir com os três pares de *primer* na mesma mistura de reagentes, foi possível assegurar a especificidade das amplificações para as três espécies na nova *multiplex*-PCR.

Com relação à padronização das concentrações de todos os reagentes que compõem a PCR, os parâmetros que apresentaram melhores resultados para a *multiplex*-PCR foram: dNTP 200 μ M; primers *P. falciparum* e *P. malariae* 0,2 μ M; *P. vivax* 0,1 μ M; enzima Taq DNA polimerase 2,5 unidades e $MgCl_2$ 3,0 mM. As diferentes concentrações de *primers* se devem a afinidades relativas de cada par em relação a sua sequência complementar no DNA de *Plasmodium*. Em relação a uma amplificação rotineira, foi necessário usar mais Taq polimerase, uma vez que para um volume final de 25 μ L, a maior parte dos autores utiliza 1,25 unidades e para a *multiplex*-PCR deste estudo foram utilizadas 2,5 unidades. O mesmo ocorreu com o cloreto de magnésio, pois foram utilizados 3,0 mM em lugar de 1,5 ou 2,0 mM. Ressaltamos que a maior concentração de cloreto de magnésio não causou aparecimento de bandas inespecíficas.

A quantidade de DNA genômico das amostras biológicas a serem testadas também foi padronizada e 50 ng foi a que apresentou a melhor sensibilidade e especificidade, resultado este difícil de ser comparado, uma vez que as publicações não falam em quantidade de DNA testada nas amplificações^{59,79,87}, se referindo sempre à quantidade em microlitros do DNA que foi extraído da amostra.

Em relação ao número total de ciclos de amplificação, foram realizados testes variando de 30 a 50 ciclos, com base no que é realizado na literatura^{52,61}. Foi possível observar um ganho de sensibilidade até 40 ciclos e decidimos, apesar de não ser usual, continuando os testes até 46 ciclos. Para nossa surpresa, até 46 ciclos houve ganho de sensibilidade na *multiplex*-PCR, o que não ocorreu ultrapassando este número. Desta forma, foi estabelecido o número total de ciclos em 46.

Com relação à temperatura de *annealing*, fomos limitados pela baixa quantidade de nucleotídeos CG no genoma do *Plasmodium* e consequentemente em nossos *primers*.

Desta forma, estabelecemos a temperatura ideal de annealing em 50°C. Temperaturas acima desta resultaram em perda significativa de sensibilidade das amplificações.

Considerando a existência de seis *primers* na mesma reação, além dos outros reagentes necessários à amplificação, seria crucial que a amplificação ocorresse com o DNA molde da amplificação (DNA do paciente) em condições ideais de denaturação, isto é, que não estivesse formando estruturas secundárias. Para tanto, consultamos a literatura para sabermos quanto tempo as 2,5 unidades de Taq DNA polimerase colocadas em cada reação poderiam permanecer ativas em temperatura de denaturação de 95°C. A literatura diz que a meia-vida da Taq polimerase é de 130 minutos a 92,5°C; 40 minutos a 95°C e 5 minutos a 97,5°C(104). Desta forma, os ciclos e temperaturas da *multiplex*-PCR foram padronizados da seguinte forma: denaturação inicial de 15 minutos a 95°C (1 ciclo); denaturação de 1 minuto a 95°C, *annealing* de 3 minutos a 50°C, extensão de 1 minuto e 30 segundos a 72°C (5 ciclos); denaturação de 30 segundos a 95°C, *annealing* de 3 minutos a 50°C, extensão de 1 minuto e 30 segundos a 72°C (39 ciclos). Se somarmos o tempo em que a reação permanece a 95°C, chegaremos a 39 minutos e 30 segundos, que em teoria poderiam ser realizados pela Taq polimerase uma vez que a meia-vida da enzima a 95°C é de 40 minutos, e foi exatamente o que encontramos nos testes de amostras clínicas.

Com a manipulação da temperatura e dos tempos de denaturação foi possível obter reações específicas sem o uso de kits comerciais que sabidamente melhoram o desempenho de amplificações do tipo *multiplex*-PCR, porém elevam substancialmente o custo das reações, dificultando o emprego da técnica em outros laboratórios.

Testes de especificidade foram realizados com DNA de plasmódios de roedores e de aves (*P. chabaudi*, *P. berghei* e *P. nucleophilum*), com DNA de outros parasitos (*Leishmania sp*, *T. gondii* etc), assim como com DNA de doadores de banco de sangue, sem histórico de infecções recentes ou viagens (deslocamento) a regiões endêmicas. Os resultados foram os esperados, isto é, não houve reações cruzadas uma vez que todas as amostras foram negativas pela *multiplex*-PCR, confirmando a especificidade da nova técnica molecular proposta neste estudo para a amplificação de *falciparum*, *vivax* e *malariae*.

As figuras 15 e 16 do estudo mostraram amplificações mistas de *P. vivax*/*P. falciparum* e de *P. vivax*/*P. malariae*, respectivamente. Os amplificadores apresentaram variações significativas de peso molecular em relação ao previsto, entre 10 e 15 bp, isto é, em relação aos alinhamentos das cepas de referências das três espécies extraídas do GenBank. No entanto quando as amostras de pacientes foram analisadas, verificou-se que os pesos moleculares dos amplificadores de *P. falciparum* variaram entre 353 e 356 bp (3bp), para *P. vivax* entre 324 e 326 (2 bp) e *P. malariae* entre 235 e 236 bp (1 bp). Estas variações poderiam estar relacionadas a origem das cepas protótipo utilizadas para os alinhamentos de sequências dos genes mitocondriais e seleção dos *primers*. Neste caso, mesmo após ter sido realizado o alinhamento de inúmeras sequências para a determinação de uma sequência “consenso”, a resultante ter sido influenciada por cepas isoladas em outros países que podem apresentar diferenças em relação às cepas brasileiras pelo fato das regiões nas quais os *primers* foram selecionados não serem constantes, isto é, serem variáveis. Esta hipótese é reforçada pelo encontro de apenas pequenas variações no peso molecular dos produtos de amplificação quando as amostras clínicas de pacientes brasileiros foram analisadas.

Para a determinação do limite de detecção (sensibilidade analítica) da *multiplex*-PCR foram feitas diluições seriadas (1:10) do plasmídeo contendo o inserto (controle positivo para *P. falciparum*, *P. vivax* ou *P. malariae*) em amostras preparadas com 50 ng de DNA genômico humano de indivíduo sadio, conforme descrito na seção de materiais e métodos. Estas amostras são chamadas de “*spiked samples*” e permitiriam definir o limite de detecção da *multiplex*-PCR para cada um dos alvos, em número de cópias da sequência alvo da amplificação. Após análise preliminar, as diluições mais próximas do limite de detecção foram testadas em várias replicatas de 20 testes para cada espécie de *Plasmodium*. O limite de detecção foi aquele no qual 95% de detecção foi encontrada (19 testes positivos em total de 20 testes). No caso de *P. falciparum* (gene *cox III*) o limite de detecção foi de 22,5 cópias do gene alvo/reação, enquanto para *P. vivax* (gene *cox I*) foi de 28,7 cópias/reação e para *P. malariae* (gene *cytb*) 32 cópias/reação. Considerando que cada parasito possui entre 20-150 cópias dos genes mitocondriais, a *multiplex*-PCR foi

capaz de detectar 1 parasito de cada uma das espécies, na reação contendo os três pares de *primers*. Este limite de detecção seria provavelmente melhor que os encontrados para a *nested*-PCR de Snounou *et al.*⁵⁹ e a *semi-nested*-PCR de Kimura *et al.*⁸⁷ comparando o desempenho dos alvos após um único *round* de amplificação. No entanto, na presente pesquisa foi possível comparar o desempenho da nova *multiplex*-PCR com a *nested*-PCR e a *semi-nested*-PCR em termos de equivalência entre as três técnicas, devido ao delineamento do estudo, uma vez que não dispúnhamos de amostras que foram negativas por *semi-nested*-PCR e positivas por *nested*-PCR ou vice-versa. Consequentemente, a análise foi feita apenas considerando o número de resultados positivos encontrados pelas três técnicas, e estes números foram equivalentes.

Entretanto, houve discordâncias na identificação das espécies infectantes, que não ocorreram de acordo com nossa hipótese inicial de trabalho, uma vez que a identificação de mais infecções mistas pela *multiplex*-PCR só ocorreu em relação à gota espessa em 8 casos (Tabela 8), enquanto esta situação foi vista em apenas 1 caso considerando a *semi-nested*-PCR (Tabela 9). Contrariamente, a situação inversa, isto é, dos testes de referência terem detectado infecção mista ou infecções causadas por mais espécies que a *multiplex*-PCR ocorreu em 4 casos na comparação com a gota espessa (Tabela 8) e em 19 casos na comparação com a *semi-nested*-PCR (Tabela 9). Salientamos que nenhuma das 10 infecções mistas causadas pelas três espécies de *Plasmodium* segundo a *semi-nested*-PCR foi confirmada pela *multiplex*-PCR, que detectou 3 casos de *Pf*, 4 casos de *Pv*, 2 casos de *Pm* e 1 caso com infecção mista *Pf/Pv* (Tabela 9). O fato da *semi-nested*-PCR ter detectado mais espécies infectantes em relação à *multiplex*-PCR pode ser explicado pela ocorrência de *carry over*, já relatada em amplificações do tipo *nested*⁹⁵. No caso da maior detecção de espécies pela gota espessa, houve 4 amostras com infecção mista *Pf/Pv* pela gota espessa e a *multiplex*-PCR só detectou *Pv*. Fatores referentes a inexperiência do microscopista, esfregaços de má qualidade, grande similaridade morfológica entre estágios jovens dos parasitos de diferentes espécies de *Plasmodium*, dentre outros, podem ter contribuído para a ocorrência de erros de identificação das espécies infectantes⁶⁷.

Analisando os resultados da presente pesquisa não pelo lado das discordâncias na identificação das espécies, e sim de acordo com a concordância entre as técnicas (coeficiente de Kappa) foi possível observar boa concordância entre a *multiplex*-PCR e a gota espessa para a identificação da espécie *falciparum* (Kappa 0,788, Tabela 12), ótima concordância para a espécie *vivax* (Kappa 0,842, Tabela 13) e boa concordância para a espécie *malariae* (Kappa 0,785, Tabela 14). Ao avaliarmos a *multiplex*-PCR e a *semi-nested*-PCR na identificação da espécie *falciparum* houve uma concordância regular entre os testes (Kappa 0,437, Tabela 15); a concordância foi boa para a espécie *vivax* (Kappa 0,768, Tabela 16) e regular para a espécie *malariae* (Kappa 0,444, Tabela 17). Sendo assim, a concordância da *multiplex*-PCR com as duas outras técnicas (gota espessa e *semi-nested*-PCR) só foi ótima e boa para a espécie *vivax*. Não deixa de ser surpreendente que a concordância dos resultados das duas técnicas moleculares tenha sido pior que a encontrada entre a *multiplex*-PCR e a gota espessa. O fato de ter sido boa e regular para as espécies *vivax* e *malariae*, respectivamente, poderia ser explicado pelas parasitemias mais baixas encontradas nas infecções causadas por estas duas espécies em relação àquela causada pela espécie *falciparum*. O real significado destas concordâncias “não ótimas” só poderá ser desvendado em estudos futuros nos quais possamos dispor de amostras que tenham tido resultados negativos pela *semi-nested* e positivos pela *nested*-PCR, ou vice-versa. Alternativamente poderíamos avaliar amostras com resultados discordantes entre *semi-nested*-PCR, *nested*-PCR e Real Time PCR com o intuito de avaliar o desempenho da nova *multiplex*-PCR em relação aos métodos moleculares de referência.

Não foram observadas variações de desempenho da *multiplex*-PCR de acordo com o tempo de armazenamento das amostras, isto é, a *multiplex*-PCR funcionou igualmente bem no teste de amostras recentemente colhidas em região endêmica que tiveram DNA extraído com kit QIAmp DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha) em relação a amostras extraídas com fenol/clorofórmio e armazenadas há mais de 20 anos.

Muito embora exista um número imenso de estudos sobre o diagnóstico molecular da malária e identificação das espécies infectantes, conforme apresentado no Quadro 1 da

parte introdutória desta pesquisa, aqueles que utilizaram delineamento técnico similar ao presente estudo, possibilitando comparações, são escassos.

Cunha *et al.*⁶⁸ desenvolveram duas PCR convencionais (1 *round* de amplificação) com *primers* de *cox I* e *cox III* para a detecção de *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente, em um estudo transversal realizado com amostras de sangue de indivíduos naturalmente expostos à malária na região da Amazônia brasileira. A capacidade de detecção foi de 0,01 parasito/ μ L, ou seja, as técnicas foram capazes de detectar até um centésimo de um único parasito presente em 1 μ L de amostra. Em nosso estudo, o limite de detecção foi de 1 parasito/reacção para as três espécies de *Plasmodium*, superior ao relatado por Cunha *et al.*⁶⁸ sendo adequado para uso em rotinas diagnósticas, lembrando que a *multiplex*-PCR apresenta a vantagem em relação ao estudo mencionado de detectar três espécies de *Plasmodium* em uma única amplificação, enquanto os outros autores realizaram amplificações em separado para duas espécies (*falciparum* e *vivax*), com todos os inconvenientes da quantidade de DNA a ser utilizada, maior gasto em reagentes, maior tempo de trabalho do manipulador, de uso dos equipamentos e do tempo para a liberação de resultados.

Echeverry *et al.*⁷⁶ compararam a *nested*-PCR 18S rRNA⁵⁹ com quatro novas amplificações realizadas com *primers* do gene mitocondrial *cox III*, específicas para a detecção das espécies *falciparum*, *vivax*, *malariae* e *ovale*. As amplificações foram chamadas de *direct-nested*-PCR¹⁰⁶ e *direct-single*-PCR ou *direct-nested*-PCR (alvo *cox III*) devido à realização das etapas de extração de DNA e o primeiro *round* de amplificação de uma única vez. Na *direct-single*-PCR apenas uma etapa de amplificação é realizada logo após a extração de DNA (extração de DNA e primeira amplificação realizadas sem interrupção), enquanto que na *direct-nested*-PCR (18S rRNA ou *cox III*) a extração de DNA e o primeiro round de amplificação foram realizados em etapa única, seguida de segundo *round* de amplificação. Inicialmente, as técnicas avaliaram 21 amostras de sangue colhidas em papel de filtro, com resultados conhecidos. A *direct-nested*-PCR 18S rRNA detectou 18/21 infecções (sendo quatro infecções mistas), enquanto a *direct-single*-PCR (*cox III*) detectou 21/21 infecções e não encontrou infecção com mais de uma

espécie. Assim como em nosso estudo, a direct-single-PCR com primers do cox III detectou menos infecções mistas em relação a direct-nested-PCR (18S rRNA).

A seguir, os mesmos autores Echeverry *et al.*⁷⁶ testaram 3.833 amostras de sangue colhidas em papel filtro de casos suspeitos das Ilhas Salomão (região endêmica). A confirmação das infecções foi feita pelo sequenciamento dos produtos de amplificação. Surpreendentemente, a direct-PCR (cox III) foi mais sensível que a direct-nested-PCR (cox III), tendo sido adotada para as comparações com a direct-nested-PCR¹⁰⁶, assim como ocorreu na etapa anterior quando as amostras de sangue colhidas em papel de filtro foram analisadas. O limite de detecção da direct-PCR cox III foi de 0,6-2 parasitos/ μ L, sendo mais sensível que a direct-nested-PCR que detectou 2-10 parasitos/ μ L, enquanto a nossa *multiplex*-PCR detectou o equivalente a 1 parasito/reação em reações com volume total de 25 μ L. Com relação à especificidade das amplificações, enquanto a direct-PCR (cox III) teve os 2% de resultados positivos confirmados por sequenciamento, a direct-nested-PCR (18S rRNA) gerou 93% de identificações incorretas de gênero e 55% de espécies, sendo que para *P. vivax* esta porcentagem de erro atingiu 60%. Na presente pesquisa não foi possível sequenciar todos os produtos de amplificação obtidos das 104 amostras provenientes de pacientes de zona endêmica, e no caso específico de identificação de menos infecções mistas, que ocorreu na presente pesquisa, não bastaria sequenciar o nosso produto de amplificação. Seria preciso reproduzir a amplificação feita há muitos anos usando a semi-nested-PCR⁸⁷ para comprovar ou não se houve *carry over*.

Stanis *et al.*⁷⁵ compararam métodos de identificação de espécies de parasitos da malária utilizando uma *multiplex*-PCR (cytb) para a detecção de *Plasmodium* e identificação das espécies *falciparum*, *vivax*, *malariae*, *ovale* e *knowlesi* que foi comparada a nested-PCR⁶¹ e à microscopia. Do total de 129 amostras de sangue colhidas em papel de filtro, tanto a *multiplex* quanto a nested-PCR identificaram 12 infecções por *P. falciparum* em lugar das 15 detectadas pela microscopia. Para *P. vivax*, a *multiplex*-PCR detectou 9 casos e a nested-PCR 12 casos, enquanto a microscopia detectou 14 casos. Dos 72 casos de *P. malariae* identificados pela microscopia, a *multiplex*-PCR detectou 58 casos como *P. knowlesi* e 10 casos como *P. malariae*, enquanto a nested-PCR identificou

59 casos como *P. knowlesi* e 7 casos como *P. malariae*. Estas discordâncias foram discutidas pelos autores como prováveis erros de identificação da microscopia devido às similaridades morfológicas entre espécies, notadamente *vivax* e *malariae* ou entre *falciparum* e *knowlesi*. Os autores concluíram que, apesar da microscopia ter detectado mais casos de malária que as técnicas moleculares, em especial a *multiplex*-PCR que apresentou resultados comparáveis à *nested*-PCR em termos de número de casos detectados, não necessitando de reamplificação e consequentemente podendo ser recomendada para o diagnóstico molecular com identificação de todas as espécies de *Plasmodium* que infectam o homem. Este trabalho concordou com o presente estudo no que se refere à equivalência em termos de número de casos detectados em relação à *semi-nested*-PCR a e *nested*-PCR e ainda no que tange à discordância na identificação de espécies.

Isozumi *et al.*⁷⁴ descreveram duas novas *nested*-PCR com *primers* dos genes mitocondriais *cox III* e *cytb* para a detecção do gênero *Plasmodium* após o primeiro *round* de amplificação, e a seguir das espécies *falciparum*, *vivax*, *malariae* e *ovale* em quatro amplificações separadas no segundo *round* de amplificação. Como acontece com frequência, os autores informaram que foram usados 6 µL de DNA na primeira amplificação e 2 µL de DNA na segunda amplificação (após diluição do primeiro amplificado 1:50). As mesmas etapas utilizadas para os *primers* do *cytb*. Estas duas novas *nested*-PCR (*cox III* e *cytb*) foram comparadas a *nested*-PCR 18S rRNA de referência⁵⁹. Amostras de sangue de residentes de Ambae (n=37), Tanna (n=40), Ilha de Vanuatu e ilhas do Lago Victoria no Quênia (n=76) foram colhidas em papel filtro. Inicialmente, os autores compararam apenas o segundo *round* de amplificação dos três sistemas (*cox III*, *cytb* e 18S rRNA) e encontraram uma amostra com identificações distintas pelo *cox III* e *cytb*, apresentando resultado negativo pela *nested*-PCR de referência e pela gota espessa. Na segunda fase do estudo, as amostras foram testadas com realização de dois *rounds* de amplificação para os três sistemas. Os resultados mostraram que não houve mais casos detectados com a realização do segundo *round* de amplificação em relação a apenas um *round* de amplificação, o que vai de encontro as nossas expectativas de realização de

amplificações com apenas uma etapa de amplificação. Ademais, a amplificação realizada com *primers* do *cox III* foi mais eficiente que a *nested*-PCR 18S rRNA com relação à detecção de mais casos positivos, notadamente nos pacientes com baixas parasitemias, o que também seria esperado devido ao maior número de cópias do gene mitocondrial, porém, surpreendentemente, a *nested*-PCR (*cytb*) foi menos eficiente que a *nested*-PCR 18S rRNA. Em uma amostra a gota espessa identificou *P. vivax*, sendo que a *nested*-PCR *cox III* identificou *P. falciparum*. Discordâncias na identificação de espécies também foram observadas no presente estudo.

Saito *et al.*⁷⁹ desenvolveram uma amplificação do tipo *multiplex* single tube-*nested*-PCR tendo como alvo o gene mitocondrial *cox III*, os mesmos descritos por Isozumi *et al.*⁷⁴ Nas amplificações com *primers* do *cox III* e *cytb*, o segundo *round* de amplificação foi realizado em um único tubo, seguido de etapa de hibridização do material amplificado em tiras cromatográficas PAS (printed-array strip) e esta etapa foi denominada STH (*Single-stranded Tag Hybridization*), e as hibridizações foram realizadas com sondas que reconhecem sequências de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, sendo o ensaio denominado de MSTNPCR (*Multiplex single-tube nested PCR*). A seguir foram testadas amostras de DNA de indivíduos provenientes do Quênia, com malária (n=152). O desempenho da nova MSTNPCR foi analisado em relação a *nested*-PCR de referência⁵⁹. A detecção da MSTNPCR foi cerca de 40 vezes superior àquela da eletroforese em gel de agarose após a *nested*-PCR. Este sistema permitiu a identificação de casos de malária causados por espécies únicas ou por mais de uma espécie (infecção mista). A sensibilidade e especificidade da MSTNPCR foi de 88,7% e 100,0%, respectivamente. Os autores concluíram que o sistema MSTNPCR apresenta várias vantagens em relação a semi-*nested*-PCR e a *nested*-PCR, amplamente utilizadas. Ademais, ele permite detecção mais rápida, reduzindo o tempo de trabalho laboratorial e o uso de reagentes, o segundo round de amplificação realizado em um único tubo minimiza o risco de contaminação durante a transferência do material amplificado da primeira reação de PCR para a segunda (*nested*-PCR). Outra vantagem do novo sistema PAS cromatográfico STH é que ele permite a visualização de bandas derivadas de vários

produtos de PCR de forma simultânea e independente. O tempo necessário desde a preparação da PCR até a detecção do sinal é de 90 minutos. O sistema MSTNPCR parece ter apresentado boa sensibilidade e especificidade em relação a *nested*-PCR de referência, o que também ocorreu com a nossa *multiplex*-PCR. Porém, apesar desta técnica ser mais rápida por ter substituído a eletroforese pela hibridização em tiras cromatográficas, esta etapa não aumentou a sensibilidade do teste como seria esperado com a realização do segundo *round* amplificação acrescido da hibridização, e os autores não mencionaram, mas a cromatografia certamente aumenta os custos da reação, que de todo modo, pode ser completada em tempo muito menor (90 minutos). Em nossa pesquisa não foi possível testar se a *multiplex*-PCR possui sensibilidade superior a *semi-nested* e *nested*-PCR devido ao delineamento do estudo, mas foi observada equivalência com estas amplificações de referência e superioridade em relação à gota espessa, com ganho em relação ao tempo de reação, custos e minimização das chances de *carry over*.

Segundo Ministério da Saúde, o diagnóstico clínico da malária não é preciso, pois outras doenças febris agudas podem apresentar sinais e sintomas semelhantes, tais como a dengue, a febre amarela, a leptospirose, a febre tifóide e muitas outras. Dessa forma, a tomada de decisão de tratar um paciente com malária deve ser baseada na confirmação laboratorial da infecção por meio da microscopia (gota espessa) ou por testes rápidos imunocromatográficos. No Brasil, as indicações para o uso dos testes rápidos vêm sendo definidas pelo Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), que prioriza localidades onde o acesso ao diagnóstico microscópico é dificultado pela distância geográfica ou por incapacidade local do serviço de saúde⁸⁵.

A confirmação parasitológica da malária é um componente essencial quer na abordagem correta do doente, quer no panorama geral de controle e erradicação da doença em nível global. Dada a rapidez com que a malária pode evoluir, além da sensibilidade e especificidade, o tempo de produção de um resultado é prioritário. Contudo, não encontramos na literatura nenhuma referência a um único procedimento que satisfizesse todos os critérios de modo a ser considerado “o teste diagnóstico ideal”. São ainda necessários investimento e investigação de modo a avaliar, melhorar e coordenar as estratégias existentes, bem como para o desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas

e protocolos de suporte para a implementação das mesmas. No entanto, acredita-se que o novo sistema de amplificação do tipo *multiplex*-PCR proposto no presente estudo, possa ser inserido na rotina diagnóstica de centros de referência de malária, como método de triagem para auxiliar no diagnóstico da malária, especialmente em casos de infecções mistas e com baixas parasitemias.

8 CONCLUSÕES

- a) Esta pesquisa desenvolveu com sucesso uma *multiplex*-PCR para a amplificação simultânea de fragmentos específicos das espécies *falciparum* (*primers* do gene *cox III*); *vivax* (*primers* do gene *cox- I*) e *malariae* (*primers* do gene *cytb*) atingindo sensibilidade analítica de 1 parasito/reação para as três espécies e especificidade de 100%.
- b) Do total de 104 amostras de pacientes com malária, oriundos de região endêmica, testados por gota espessa, *semi-nested*-PCR, *nested*-PCR, Real Time PCR e pela nova *multiplex*-PCR, em termos de detecção, a *multiplex*-PCR apresentou resultados equivalentes à *semi-nested*, *nested*-PCR e a Real Time PCR e superiores a gota espessa. Devido ao delineamento do estudo não foi possível determinar se a *multiplex*-PCR é mais sensível que a *semi-nested*-PCR, *nested*-PCR e a Real Time PCR.
- c) A concordância entre a *multiplex*-PCR e a gota espessa ou entre a *multiplex*-PCR e a *semi-nested*-PCR foi boa/regular na identificação da espécie *falciparum*, respectivamente; ótima/boa em relação a gota espessa e *semi-nested*-PCR para a espécie *vivax*, e boa/regular em relação a gota espessa e *semi-nested*-PCR na identificação da espécie *malariae*. Em outras palavras, houve discordância das espécies identificadas pela gota espessa e pela *multiplex*-PCR em 22,8% das amostras testadas e entre a *semi-nested*-PCR e a *multiplex*-PCR em 21,6% das amostras analisadas.

9 PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Os resultados desta pesquisa sugerem que a *multiplex*-PCR possa ser usada em laboratórios de rotina devido a elevada sensibilidade e especificidade, capacidade de detectar infecções mistas, reduzindo o tempo de análise, o custo de reagentes e as possíveis contaminações (*carry over*) que podem ocorrer em amplificações do tipo *nested*. No entanto, estudos prospectivos utilizando uma casuística mais numerosa, com amostras provenientes de regiões endêmicas com resultados negativos por *nested*-PCR que tenham sido positivos por *semi-nested*-PCR ou vice-versa, e também amostras analisadas por Real Time PCR provenientes de regiões de alta e baixa endemicidade, neste último caso citamos como exemplo o vale do Ribeira e o litoral do Estado de São Paulo onde têm sido relatados casos de infecções humanas por *P. vivax* e *P. malariae*^{56,57}. A avaliação de amostras discordantes pelos métodos moleculares de referência poderia determinar se a nova *multiplex*-PCR é tão ou mais sensível que as mesmas, reforçando a utilidade desta nova amplificação e sua introdução na rotina diagnóstica de laboratórios dedicados ao diagnóstico molecular da malária.

Também seria importante a construção de um controle positivo único para as três espécies de *Plasmodium*, por meio da inserção dos três insertos (controles positivos) de cada uma das espécies estudadas (*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*) em um único plasmídeo, para que não haja a necessidade da utilização de três controles positivos em cada experimento, conforme ocorreu neste estudo.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neghina R, Neghina AM, Marincu I, Iacobiciu I. Malaria, a journey in time: in search of the lost myths and forgotten stories. *Am J Med Sci*. 2010;340(6):492–8.
2. Scotto G. Aggiornamenti sulla malaria. Vol. 18, *Infezioni in Medicina*. 2010. p. 213–34.
3. World Health Organization. World malaria report 2018. Geneva; 2018. [citado em 05 out 2017] <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/>
4. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J*. 2016;15(1):284.
5. Brasil. Ministério da Saúde. 2017. Ministério da saúde lança campanha para combate a malaria. [Citado em 05 out 2017] <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/28222-ministerio-da-saude-lanca-campanha-para-combate-a-malaria>.
6. Brasil, Ministério da Saúde. Brasil registra menor número de casos de malária nos últimos 35 anos. 2016; [citado em 05 out 2017] <http://portalms.saude.gov.br/noticias/svs/23370-brasil-registra-menor-numero-de-casos-de-malaria-nos-ultimos-35-anos> Acesso em 05 out 2017.
7. Pan American Health Organization. Actualización Epidemiológica. Aumento de malaria en las Américas. 2018;5. [citado em 05 out 2017] http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=43437&lang=es
8. Tuteja R. Malaria - An overview. *FEBS J*. 2007;274(18):4670–9.
9. Gupta H, Srivastava S, Chaudhari S, Vasudevan TG, Hande MH, D'souza SC, et al. New molecular detection methods of malaria parasites with multiple genes from genomes. *Acta Trop*. 2016;160:15–22.
10. Verra F, Angheben A, Martello E, Giorli G, Perandin F, Bisoffi Z. A systematic review of transfusion-transmitted malaria in non-endemic areas. *Malar J*. 2018;17(1):36.
11. Braz RM, Barcellos C. Análise do processo de eliminação da transmissão da malária na Amazônia brasileira com abordagem espacial da variação da incidência da doença em 2016*. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2018;27(3):e2017253.
12. De M. Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2013. [citado em 05 out 2017] <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/16/Mapa-de-risco-mal-ria-2017.pdf>

13. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J.* 2010;9:115.
14. Santos E de A, Primo DG, Sucupira IMC, Cassiano GC, Barbosa DRL, Viana GMR, et al. Frequency of *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein genotypes in humans and anopheline mosquitoes in an endemic area of southeastern Pará State, Brazil. *Rev Pan-Amazônica Saúde.* 2016;7(3):57–64.
15. CDC Centers for Disease Control and Prevention. U.S. Department of Health and Human Services Center for Disease Control and Prevention 2011b. A-Z Index: Malaria About Malária.
16. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol.* 2009;25(5):220–7.
17. Monteiro MR de CC, Ribeiro MC, Fernandes SC. Aspectos clínicos e epidemiológicos da malária em um hospital universitário de Belém, Estado do Pará, Brasil. *Rev Pan-Amazônica Saúde.* 2013;4(2):33–43.
18. Clark IA, Alleva LM, Vissel B. The roles of TNF in brain dysfunction and disease. *Pharmacol Ther.* 2010;128(3):519–48.
19. Min HMK, Changrob S, Soe PT, Han JH, Muh F, Lee S-K, et al. Immunogenicity of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 paralog in the induction of naturally acquired antibody and memory B cell responses. *Malar J.* 2017;16(1):354.
20. França CT, He W-Q, Gruszczyk J, Lim NTY, Lin E, Kiniboro B, et al. *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins Are Key Targets of Naturally Acquired Immunity in Young Papua New Guinean Children. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(9):e0005014.
21. Halder K, Mohandas N. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2009;1(574):87–93.
22. Krieger H, Durlacher RR, Menezes MJ, Camargo EP, Silva LHP, Alves FP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(6):641–8.
23. Nkoghe D, Akue J-P, Gonzalez J-P, Leroy EM. Prevalence of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic rural Gabonese populations. *Malar J.* 2011;10(1):33.
24. Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MVG. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J.* 2017;16(1):273.

25. Pan American Health Organization. Report on the Situation of Malaria in the Americas 2014. Washington, D.C; 2016. [citado em 05 out 2017] <https://www.paho.org/hq/index.php?lang=pt>.
26. Machado P, Mendes C, Rosário VE do, Arez AP. A contribuição dos polimorfismos humanos do eritrócito na proteção contra a malária. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2010;1(4):85–96.
27. Flint J, Hill AVS, Bowden DK, Oppenheimer SJ, Sill PR, Serjeantson SW, et al. High frequencies of α -thalassaemia are the result of natural selection by malaria. *Nature*. 1986;321(6072):744–50.
28. Scopel KKG, Fontes CJF, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apuacás-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Trop*. 2004;90(1):61–4.
29. Erdman LK, Kain KC. Molecular diagnostic and surveillance tools for global malaria control. *Travel Med Infect Dis*. 2008;6(1–2):82–99.
30. Lindo JF, Bryce JH, Ducasse MB, Howitt C, Barrett DM, Lorenzo Morales J, et al. *Plasmodium malariae* in Haitian refugees, Jamaica. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(6):931–3.
31. Cavasini MTV, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira MU. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, Western Brazilian Amazon? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;33(5):489–92.
32. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: Parasite and Disease. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(4):579–92.
33. World Health Organization. World malaria report 2016. Geneva: WHO; 2016. [citado em 05 out 2017] <http://www.who.int/malaria/areas/diagnosis>
34. Fundação Nacional de Saúde. Manual de terapêutica da malária. Brasília: 6ª ed; Dez 2001.
35. Rosanas-Urgell A, Mueller D, Betuela I, Barnadas C, Iga J, Zimmerman PA, et al. Comparison of diagnostic methods for the detection and quantification of the four sympatric *Plasmodium* species in field samples from Papua New Guinea. *Malar J*. 2010;9(8):361.
36. Polley SD, Gonzalez IJ, Mohamed D, Daly R, Bowers K, Watson J, et al. Clinical Evaluation of a Loop-Mediated Amplification Kit for Diagnosis of Imported Malaria. *J Infect Dis*. 2013;208(4):637–44.
37. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and Infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. *Clin Microbiol*

Rev. 2011;24(2):377–410.

38. Mangold KA, Manson RU, Koay ESC, Stephens L, Regner M, Thomson RB, et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Microbiol.* 200;43(5):2435–40.
39. Noedl H, Yingyuen K, Laoboonthai A, Fukuda M, Sirichaisinthop J, Miller RS. Sensitivity and specificity of an antigen detection ELISA for malaria diagnosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(6):1205–8.
40. Unit V. Proposal for an Evidence Review Group (ERG) on diagnosis of *Plasmodium falciparum* in low transmission areas. 2013;58:11–3.
41. Proux S, Suwanarusk R, Barends M, Zwang J, Price RN, Leimanis M, et al. Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection. *Malar J.* 2011;10(1):323.
42. Hikosaka K, Kita K, Tanabe K. Diversity of mitochondrial genome structure in the phylum Apicomplexa. *Mol Biochem Parasitol.* 2013;188(1):26–33.
43. Preston MD, Campino S, Assefa SA, Echeverry DF, Ocholla H, Amambua-Ngwa A, et al. A barcode of organellar genome polymorphisms identifies the geographic origin of *Plasmodium falciparum* strains. *Nat Commun.* 2014;5(1):4052.
44. Gajbhiye S, Patra PK, Yadav MK. New insights into the factors affecting synonymous codon usage in human infecting *Plasmodium* species. *Acta Trop.* 2017;176(June):29–33.
45. Délicat-Loembet L, Rougeron V, Ollomo B, Arnathau C, Roche B, Elguero E, et al. No Evidence for Ape *Plasmodium* Infections in Humans in Gabon. Braga EM, editor. *PLoS One.* 2015;10(6):e0126933.
46. Sharma I, Pasha ST, Sharma YD. Complete nucleotide sequence of the *Plasmodium vivax* 6 kb element. *Mol Biochem Parasitol.* 1998;97(1–2):259–63.
47. Tyagi S, Pande V, Das A. Whole Mitochondrial Genome Sequence of an Indian *Plasmodium falciparum* Field Isolate. *Korean J Parasitol.* 2014;52(1):99–103.
48. Wilson RJ, Williamson DH. Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997;61(1):1–16.
49. Xu W, Morris U, Aydin-Schmidt B, Msellem MI, Shakely D, Petzold M, et al. SYBR Green Real-Time PCR-RFLP Assay Targeting the *Plasmodium* Cytochrome B Gene – A Highly Sensitive Molecular Tool for Malaria Parasite Detection and Species Determination. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120210.

50. Musunuru K, Hickey KT, Al-Khatib SM, Delles C, Fornage M, Fox CS, et al. Basic Concepts and Potential Applications of Genetics and Genomics for Cardiovascular and Stroke Clinicians. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8(1):216–42.
51. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*. 2012 May;(63):e3998
52. Gama BE, Silva-Pires F do ES, Lopes MNR, Cardoso MAB, Britto C, Torres KL, et al. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Exp Parasitol*. 2007;116(4):427–32.
53. Demas A, Oberstaller J, DeBarry J, Lucchi NW, Srinivasamoorthy G, Sumari D, et al. Applied Genomics: Data Mining Reveals Species-Specific Malaria Diagnostic Targets More Sensitive than 18S rRNA. *J Clin Microbiol*. 2011;49(7):2411–8.
54. Cordray MS, Richards-Kortum RR. Emerging Nucleic Acid–Based Tests for Point-of-Care Detection of Malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;87(2):223–30.
55. Patel JC, Oberstaller J, Xayavong M, Narayanan J, DeBarry JD, Srinivasamoorthy G, et al. Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (RealAmp) for the Species-Specific Identification of *Plasmodium vivax*. Snounou G, editor. *PLoS One*. 2013;8(1):e54986.
56. Curado I, Duarte AMRC, Lal AA, Oliveira SG, Kloetzel JK. Antibodies anti Bloodstream and Circumsporozoite Antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae*/*P. brasilianum*) in Areas of Very Low Malaria Endemicity in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997;92(2):235–43.
57. Couto RD, Latorre MDRDDO, Di Santi SM, Natal D. [Autochthonous malaria notified in the State of São Paulo: clinical and epidemiological characteristics from 1980 to 2007]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(1):52–8.
58. Pakalapati D, Garg S, Middha S, Acharya J, Subudhi AK, Boopathi AP, et al. Development and evaluation of a 28S rRNA gene-based nested PCR assay for *P. falciparum* and *P. vivax*. *Pathog Glob Health*. 2013;107(4):180–8.
59. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;61(2):315–20.
60. Paglia MG, Vairo F, Bevilacqua N, Ghirga P, Narciso P, Severini C, et al. Molecular diagnosis and species identification of imported malaria in returning travellers in Italy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;72(2):175–80.

61. Murphy SC, Prentice JL, Williamson K, Wallis CK, Fang FC, Fried M, et al. Real-time quantitative reverse transcription PCR for monitoring of blood-stage *Plasmodium falciparum* infections in malaria human challenge trials. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86(3):383–94.
62. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2–3):95–125.
63. Alam MS, Mohon AN, Mustafa S, Khan WA, Islam N, Karim MJ, et al. Real-time PCR assay and rapid diagnostic tests for the diagnosis of clinically suspected malaria patients in Bangladesh. *Malar J.* 2011;10(1):175.
64. Han E-T, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, et al. Detection of Four *Plasmodium* Species by Genus- and Species-Specific Loop-Mediated Isothermal Amplification for Clinical Diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2007;45(8):2521–8.
65. Singh R, Savargaonkar D, Bhatt R, Valecha N. Rapid detection of *Plasmodium vivax* in saliva and blood using loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *J Infect.* 2013;67(3):245–7.
66. Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature.* 2008;455(7214):757–63.
67. Rubio JM, Benito A, Roche J, Berzosa PJ, García ML, Micó M, et al. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(2):183–7.
68. Cunha MG, Medina TS, Oliveira SG, Marinho AN, Póvoa MM, Ribeiro-dos-Santos AKC. Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) method based on amplification of mitochondrial DNA to detect *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Acta Trop.* 2009;111(1):35–8.
69. Steenkeste N, Incardona S, Chy S, Duval L, Ekala M-T, Lim P, et al. Towards high-throughput molecular detection of *Plasmodium*: new approaches and molecular markers. *Malar J.* 2009;8(1):86.
70. Veron V, Simon S, Carme B. Multiplex real-time PCR detection of *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae* in human blood samples. *Exp Parasitol.* 2009;121(4):346–51.
71. Putaporntip C, Buppan P, Jongwutiwes S. Improved performance with saliva and urine as alternative DNA sources for malaria diagnosis by mitochondrial DNA-based PCR assays. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(10):1484–91.
72. Farrugia C, Cabaret O, Botterel F, Bories C, Foulet F, Costa J-M, et al. Cytochrome b Gene

- Quantitative PCR for Diagnosing *Plasmodium falciparum* Infection in Travelers. *J Clin Microbiol*. 2011;49(6):2191–5.
73. Souza CRT, Carvalho TAA, Amaral RCG, Cunha LS, Cunha MG, Guerreiro JF. Prevalence of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in an area of transmission located in Pará State, Brazil, determined by amplification of mtDNA using a real-time PCR assay. *Genet Mol Res*. 2012;11(3):3409–13.
 74. Isozumi R, Fukui M, Kaneko A, Chan CW, Kawamoto F, Kimura M. Improved detection of malaria cases in island settings of Vanuatu and Kenya by PCR that targets the *Plasmodium* mitochondrial cytochrome c oxidase III (cox3) gene. *Parasitol Int*. 2015;64(3):304–8.
 75. Stanis CS, Song BK, Chua TH, Lau YL, Jelip J. Evaluation of new multiplex PCR primers for the identification of *Plasmodium* species found in Sabah, Malaysia. *Turkish J Med Sci*. 2016;46(1):207–18.
 76. Echeverry DF, Deason NA, Davidson J, Makuru V, Xiao H, Niedbalski J, et al. Human malaria diagnosis using a single-step direct-PCR based on the *Plasmodium* cytochrome oxidase III gene. *Malar J*. 2016;15(1):128.
 77. Srisutham S, Saralamba N, Malleret B, Rénia L, Dondorp AM, Imwong M. Four human *Plasmodium* species quantification using droplet digital PCR. Carvalho LH, editor. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175771.
 78. Shahwani MN, Nisar S, Aleem A, Panezai M, Afridi S, Malik SI. Amplification of Mitochondrial DNA for detection of *Plasmodium vivax* in Balochistan. *J Pak Med Assoc*. 2017;67(5):677–81.
 79. Saito T, Kikuchi A, Kaneko A, Isozumi R, Teramoto I, Kimura M, et al. Rapid and sensitive multiplex single-tube nested PCR for the identification of five human *Plasmodium* species. *Parasitol Int*. 2018;67(3):277–83.
 80. Batista-Dos-Santos SA, Freitas DRC, Raiol M, Cabral GF, Feio AC, Póvoa MM, et al. Strategy to improve malaria surveillance system preventing transfusion-transmitted malaria in blood banks using molecular diagnostic. *Malar J*. 2018;17(1):344.
 81. WHO. World Malaria Report, World Health Organization, Geneva; 2013. [citado em 05 out 2017] https://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/
 82. Rafael ME, Taylor T, Magill A, Lim Y-W, Girosi F, Allan R. Reducing the burden of childhood malaria in Africa: the role of improved. *Nature*. 2006;444 Suppl:39–48.
 83. Organização Pan-Americana da Saúde. Malária. Brasília: OPAS; 2016. [citado em 05 out 2017] http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5287:malaria&catid=

1016:bra-01-noticias&Itemid=875

84. Hanscheid T. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clin Lab Haematol.* 1999;21(4):235–45.
85. Brasil, Ministério da Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. *Cad Saude Publica.* 2010; [citado em 05 out 2017]
http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guia_bolso.pdf
86. Hänscheid T, Grobusch MP. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *Trends Parasitol.* 2002;18(9):395–8.
87. Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol Int.* 1997;46(2):91–5.
88. Gonçalves RM, Scopel KKG, Bastos MS, Ferreira MU. Cytokine Balance in Human Malaria: Does *Plasmodium vivax* Elicit More Inflammatory Responses than *Plasmodium falciparum*? Snounou G, editor. *PLoS One.* 2012;7(9):e44394.
89. Ferreira UM, Liu Q, Zhou M, Kimura M, Kaneko O, Thien HVAN, et al. Stable Patterns of Allelic Diversity at the Merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from southern Vietnam. *J Eukaryot Microbiol.* 1998;45(1):131–6.
90. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens.* 1992;39(5):225–35.
91. Hirata MH, Tavares V, Dominguez R, Hirata C. *Da Biologia Molecular À Medicina : Métodos.* Med Ribeirão Preto. 2006;39(4):522–4.
92. Blais J, Lavoie SB, Giroux S, Bussieres J, Lindsay C, Dionne J, et al. Risk of Misdiagnosis Due to Allele Dropout and False-Positive PCR Artifacts in Molecular Diagnostics. *J Mol Diagnostics.* 2015;17(5):505–14.
93. Borysiak MD, Kimura KW, Posner JD. NAIL: Nucleic Acid detection using Isotachophoresis and Loop-mediated isothermal amplification. *Lab Chip.* 2015;15(7):1697–707.
94. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(3):550–76.
95. Sobral A, Freitas CM de. Modelo de organizao de indicadores para operacionalizao dos

determinantes socioambientais da saúde. *Saúde e Soc.* 2010;19(1):35–47.

96. Krampa FD, Aniweh Y, Awandare GA, Kanyong P. Recent Progress in the Development of Diagnostic Tests for Malaria. *Diagnostics* (Basel, Switzerland). 2017;7(3):54.
97. Mathison BA, Pritt BS. Update on Malaria Diagnostics and Test Utilization. *J Clin Microbiol.* 2017;55(7):2009–17.
98. Amir A, Cheong F-W, De Silva JR, Lau Y-L. Diagnostic tools in childhood malaria. *Parasit Vectors.* 2018;11(1):53.
99. Zhao Y, Zhao Y, Lv Y, Liu F, Wang Q, Li P, et al. Comparison of methods for detecting asymptomatic malaria infections in the China–Myanmar border area. *Malar J.* 2017;16(1):159.
100. Setiadi W, Sudoyo H, Trimarsanto H, Sihite BA, Saragih RJ, Juliawaty R, et al. A zoonotic human infection with simian malaria, *Plasmodium knowlesi*, in Central Kalimantan, Indonesia. *Malar J.* 2016;15(1):218.
101. Lloyd YM, Esemu LF, Antallan J, Thomas B, Tassi Yunga S, Obase B, et al. PCR-based detection of *Plasmodium falciparum* in saliva using mitochondrial *cox3* and *varATS* primers. *Trop Med Health.* 2018;46(1):22.
102. Miguel-Oteo M, Jiram AI, Ta-Tang TH, Lanza M, Hisam S, Rubio JM. Nested multiplex PCR for identification and detection of human *Plasmodium* species including *Plasmodium knowlesi*. *Asian Pac J Trop Med.* 2017;10(3):299–304.
103. Li M, Chen S-S. The tendency to recreate ancestral CG dinucleotides in the human genome. *BMC Evol Biol.* 2011;11(1):3.
104. Innis MA, Gelfand DH, SninskyJJ, White TJ. *PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications.* San Diego, California: Academic Press, Inc; 1990. p. 129–41.
105. Lima GFMC, Levi JE, Geraldi MP, Sanchez MCA, Segurado AA, Hristov AD, et al. Malaria diagnosis from pooled blood samples: comparative analysis of real-time PCR, nested PCR and immunoassay as a platform for the molecular and serological diagnosis of malaria on a large-scale. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(6):691–700.
106. Snounou G, Singh B. Nested PCR Analysis of *Plasmodium* Parasites. In: *Malaria Methods and Protocols.* New Jersey: Humana Press; 2002. p. 189–204.
107. Brasil. Ministério da Saúde. 2015. Testes Rápidos para o Diagnóstico de Malária - Pf/Pf/Pv. [Citado em 15 jan 2019] <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/abril/20/Folder->

teste-rapido-malaria-2015-grafica-arte-final-13.04.2015.pdf .

108. Ross R: An improved method for the microscopical diagnosis of intermittent fever. Lancet 1903, 161:86.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 09 de Março de 2016

Ilmo(a)
Dr(a). Thelma Suely Okay
(aos cuidados de Wilson Domingues)

A Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, tomou ciência do projeto classificado sob o número CPE-IMT 000307 e intitulado 'Padronização e validação de um multiplex-PCR baseado na amplificação do gene do citocromo b (cytb) de Plasmodium sp. para o diagnóstico de malária e a diferenciação das espécies falciparum, vivax e malariae'.
O projeto deverá ser enviado ao Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para aprovação final.

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

ANEXO B – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/08/2016, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 274/16 intitulado: “PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MULTIPLEX-PCR BASEADO NA AMPLIFICAÇÃO DO GENE DO CITOCROMO B (CYTB) DE PLASMODIUM SP. PARA O DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA E A DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES FALCIPARUM, VIVAX E MALARIAE.” apresentado pelo Departamento de MEDICINA TROPICAL

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra “c”).

Pesquisador (a) Responsável: Thelma Suely Okay

Pesquisador (a) Executante: Wilson Domingues

CEP-FMUSP, 17 de Agosto de 2016.

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fm@usp.br

ANEXO C – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26.10.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **968/06**, intitulado: "Estudo da influência de polimorfismos genéticos na susceptibilidade à malária em população de áreas endêmicas do Brasil", apresentado pela Área de Fisiopatologia Experimental, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX, 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Sandra do Lago Moraes

Pesquisadores Executantes: Fabiana Maria de Souza Leoratti

CAPPesq, 26 de Outubro de 2006.

Encaminhe-se a CPG-FMUSP
para as devidas providências.
SP, 07.11.06

[Assinatura]
Prof. Dra. Eli Garcia Caldini
Vice Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Fisiopatologia Experimental

[Assinatura]
PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

9/11
[Assinatura]

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Dr. Ariberto de Campos, 221, 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP
Fone: (11) 5073-4421 - Fax: (11) 5069-6491 - e-mail: cappel@hcfmusp.br / direcao@cappel@hcfmusp.br

ANEXO D – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
D.A.
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL 3671
SAO PAULO - SPAS11

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 29.11.01, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 439/01 intitulado: "Padronização, avaliação e aplicação do método Western-Blotting no diagnóstico de laboratório da sífilis congênita e adquirida", apresentado pela ÁREA DE FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

- Pesquisador Responsável: Dr. Antônio Walter Ferreira
- Pesquisadora Executante: Dra. Elaine Antunes de Lemos

CAPPesq, 29 de Novembro de 2001.

PROF. DR. JORGE KALIL FILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

ANEXO E – ANÁLISE DO PRIMER FORWARD DE *P. falciparum* NO PROGRAMA BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Plasmodium falciparum isolate AO40_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923468.1
Plasmodium falciparum isolate A117_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923467.1
Plasmodium falciparum isolate B024_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923466.1
Plasmodium falciparum isolate B131_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923465.1
Plasmodium falciparum isolate C153_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923464.1
Plasmodium falciparum isolate C113_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923463.1
Plasmodium falciparum isolate B175_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923462.1
Plasmodium falciparum isolate B047_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923461.1
Plasmodium falciparum isolate B063_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923460.1
Plasmodium falciparum isolate C154_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923459.1
Plasmodium falciparum isolate B133_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923458.1
Plasmodium falciparum isolate B097_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923457.1
Plasmodium falciparum isolate B143_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923456.1
Plasmodium falciparum isolate C159_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923455.1
Plasmodium falciparum isolate C115_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923454.1
Plasmodium falciparum isolate C152_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923453.1
Plasmodium falciparum isolate C103_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923452.1
Plasmodium falciparum isolate C139_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923451.1
Plasmodium falciparum isolate B168_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923450.1
Plasmodium falciparum isolate C156_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923449.1
Plasmodium falciparum isolate C116_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923448.1
Plasmodium falciparum isolate XOA133PNG mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923446.1
Plasmodium falciparum isolate XOA126PNG mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923445.1
Plasmodium falciparum isolate XOA160PNG mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923444.1
Plasmodium falciparum isolate XOA135PNG mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923443.1
Plasmodium falciparum isolate XOA166PNG mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923442.1
Plasmodium falciparum isolate XOH35PNG mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923441.1
Plasmodium falciparum isolate XOA162PNG mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923440.1
Plasmodium falciparum isolate XOH353PNG mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923438.1
Plasmodium falciparum isolate XOH387PNG mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923437.1
Plasmodium falciparum isolate XOH393PNG mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923434.1
Plasmodium falciparum isolate XOH366PNG mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923433.1
Plasmodium falciparum isolate XOH421PNG mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923432.1
Plasmodium falciparum isolate XOH419PNG mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923431.1
Plasmodium falciparum isolate XOH360PNG mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923429.1
Plasmodium falciparum isolate XOH355PNG mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923427.1

ANEXO F – ANÁLISE DO *PRIMER REVERSE* DE *P. falciparum* NO PROGRAMA BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Plasmodium falciparum complete mitochondrial genome, isolate K1	42.1	42.1	100%	0.084	100%	NC_037526.1
Plasmodium falciparum isolate Pm01Panama mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923500.1
Plasmodium falciparum isolate PB14Panama mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923499.1
Plasmodium falciparum isolate P009Panama mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923498.1
Plasmodium falciparum isolate DA04Panama mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923497.1
Plasmodium falciparum isolate DA03Panama mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923496.1
Plasmodium falciparum isolate DA02Panama mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923495.1
Plasmodium falciparum isolate 413Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923494.1
Plasmodium falciparum isolate 411Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923493.1
Plasmodium falciparum isolate 406Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923492.1
Plasmodium falciparum isolate 254Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923491.1
Plasmodium falciparum isolate 230Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923490.1
Plasmodium falciparum isolate 172Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923489.1
Plasmodium falciparum isolate 165Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923488.1
Plasmodium falciparum isolate 164Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923487.1
Plasmodium falciparum isolate 132Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923486.1
Plasmodium falciparum isolate 128Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923485.1
Plasmodium falciparum isolate 127Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923484.1
Plasmodium falciparum isolate 125Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923483.1
Plasmodium falciparum isolate 123Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923482.1
Plasmodium falciparum isolate 120Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923481.1
Plasmodium falciparum isolate 53Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923480.1
Plasmodium falciparum isolate 48Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923479.1
Plasmodium falciparum isolate 41Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923478.1
Plasmodium falciparum isolate 36Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923477.1
Plasmodium falciparum isolate 9Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923476.1
Plasmodium falciparum isolate 4Indo mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923475.1
Plasmodium falciparum isolate B036_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923474.1
Plasmodium falciparum isolate B032_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923473.1
Plasmodium falciparum isolate C147_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923472.1
Plasmodium falciparum isolate C114_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923471.1
Plasmodium falciparum isolate A111_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923470.1
Plasmodium falciparum isolate B151_TAN mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.084	100%	KY923469.1

ANEXO G – ANÁLISE DOS *PRIMERS FORWARD/REVERSE* DE *P. falciparum* NO PROGRAMA BLAST

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CACAATAAAATAATGTAGTAT	21	44.51	19.05	5.00	4.00
Reverse primer	ACTTCTGGTATGTTATCTATC	21	49.50	33.33	2.00	2.00

Products on target templates

>[NC_037526.1](#) Plasmodium falciparum complete mitochondrial genome, isolate K1

```
product length = 346
Forward primer 1 CACAATAAAATAATGTAGTAT 21
Template       955 ..... 975
Reverse primer 1 ACTTCTGGTATGTTATCTATC 21
Template       1300 ..... 1280
```

>[KY923500.1](#) Plasmodium falciparum isolate Pm01Panama mitochondrion, complete genome

```
product length = 346
Forward primer 1 CACAATAAAATAATGTAGTAT 21
Template       929 ..... 949
Reverse primer 1 ACTTCTGGTATGTTATCTATC 21
Template       1274 ..... 1254
```

>[KY923499.1](#) Plasmodium falciparum isolate PB14Panama mitochondrion, complete genome

```
product length = 346
Forward primer 1 CACAATAAAATAATGTAGTAT 21
Template       929 ..... 949
Reverse primer 1 ACTTCTGGTATGTTATCTATC 21
Template       1274 ..... 1254
```

>[KY923498.1](#) Plasmodium falciparum isolate P009Panama mitochondrion, complete genome

```
product length = 346
Forward primer 1 CACAATAAAATAATGTAGTAT 21
Template       929 ..... 949
Reverse primer 1 ACTTCTGGTATGTTATCTATC 21
Template       1274 ..... 1254
```

>[KY923497.1](#) Plasmodium falciparum isolate DA04Panama mitochondrion, complete genome

ANEXO H – ANÁLISE DO *PRIMER FORWARD* DE *P. vivax* NO PROGRAMA BLAST

Plasmodium vivax isolate BP1 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598096.1
Plasmodium vivax isolate RB68 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598093.1
Plasmodium vivax isolate RB61 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598090.1
Plasmodium vivax isolate PC47 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598084.1
Plasmodium vivax isolate AD89 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598076.1
Plasmodium vivax isolate AD80 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598074.1
Plasmodium vivax isolate TG57 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598072.1
Plasmodium vivax isolate TG48 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598070.1
Plasmodium vivax isolate TG46 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598069.1
Plasmodium vivax isolate TG42 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598068.1
Plasmodium vivax isolate TFF128 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598067.1
Plasmodium vivax isolate TFF30 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598066.1
Plasmodium vivax isolate TFF23 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598065.1
Plasmodium vivax isolate TFF20 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598064.1
Plasmodium vivax isolate TFF13 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598063.1
Plasmodium vivax isolate TFF1 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598061.1
Plasmodium vivax isolate TF105 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598060.1
Plasmodium vivax isolate TF14 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598059.1
Plasmodium vivax isolate TF4 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598058.1
Plasmodium vivax isolate TE26 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598057.1
Plasmodium vivax isolate TC141 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598055.1
Plasmodium vivax isolate TC106 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598052.1
Plasmodium vivax isolate TC28 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598050.1
Plasmodium vivax isolate TC22 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598048.1
Plasmodium vivax isolate TB128 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598045.1
Plasmodium vivax isolate TB98 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598043.1
Plasmodium vivax isolate TB66 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598042.1
Plasmodium vivax isolate TB44 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598041.1
Plasmodium vivax isolate T124 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598039.1
Plasmodium vivax isolate T107 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598038.1
Plasmodium vivax isolate T131 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598037.1
Plasmodium vivax isolate T101 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598036.1
Plasmodium vivax isolate T077 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY598035.1
Plasmodium simium isolate Fonseca MRA-353 mitochondrion, complete genome	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY722798.1
Plasmodium simium cytochrome c oxidase subunit III (COIII) gene, complete cds; cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; and cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY800110.1
Plasmodium vivax isolate pv02137 cytochrome c oxidase subunit III (coxIII) gene, complete cds; cytochrome c oxidase subunit I (coxI) gene, partial cds; and cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY791692.1
Plasmodium vivax isolate pvKamo cytochrome c oxidase subunit III (coxIII) gene, complete cds; cytochrome c oxidase subunit I (coxI) gene, partial cds; and cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY791691.1
Plasmodium vivax isolate pvChesson cytochrome c oxidase subunit III (coxIII) gene, complete cds; cytochrome c oxidase subunit I (coxI) gene, partial cds; and cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY791690.1
Plasmodium vivax isolate pv2108 cytochrome c oxidase subunit III (coxIII) gene, complete cds; cytochrome c oxidase subunit I (coxI) gene, partial cds; and cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY791689.1
Plasmodium vivax isolate pv2078 cytochrome c oxidase subunit III (coxIII) gene, complete cds; cytochrome c oxidase subunit I (coxI) gene, partial cds; and cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial	46.1	46.1	100%	0.008	100%	AY791688.1

ANEXO I – ANÁLISE DO *PRIMER REVERSE* DE *P. vivax* NO PROGRAMA BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Triticum aestivum genome assembly, chromosome: 2B	34.2	64.4	100%	20	100%	LS992084.1
Legionella pneumophila strain NCTC11404 genome assembly, chromosome: 1	34.2	34.2	100%	20	100%	LS483410.1
Plasmodium cf. vivax isolate UGpts18_FS_SGA5.3 cytochrome oxidase subunit I (cox1) gene, partial cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618575.1
Plasmodium cf. vivax isolate NKggg1167_FS_SGA5.9 cytochrome oxidase subunit I (cox1) gene, partial cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618573.1
Plasmodium cf. vivax isolate LMggg1932_FS_SGA5.2 cytochrome oxidase subunit I (cox1) gene, partial cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618572.1
Plasmodium cf. vivax isolate KGggg1229_FS_SGA5.12 cytochrome oxidase subunit I (cox1) gene, partial cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618571.1
Plasmodium cf. vivax isolate KApts1680_FS_SGA5.2 cytochrome oxidase subunit I (cox1) gene, partial cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618570.1
Plasmodium cf. vivax isolate EKggg1179_FS_SGA40.6 cytochrome oxidase subunit I (cox1) gene, partial cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618569.1
Plasmodium cf. vivax isolate BQpt392_FS_SGA5.4 cytochrome oxidase subunit I (cox1) gene, partial cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618568.1
Plasmodium cf. vivax isolate SYpt32_FD_SGA5.6 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; and cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618566.1
Plasmodium cf. vivax isolate SYpt32_FD_SGA2.1 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; and cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618565.1
Plasmodium cf. vivax isolate SYpt1_FD_SGA20.8 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; and cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618564.1
Plasmodium cf. vivax isolate NKggg1167_FD_SGA5.3 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; and cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618563.1
Plasmodium cf. vivax isolate MSggg7183_FD_SGA2.2 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; and cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618562.1
Plasmodium cf. vivax isolate LBggg1222_FD_SGA5.8 cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b genes, partial cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618561.1
Plasmodium cf. vivax isolate LBggg1222_FD_SGA5.6 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; and cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618560.1
Plasmodium cf. vivax isolate LBggg1222_FD_SGA5.22 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; and cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618559.1
Plasmodium cf. vivax isolate LBggg1222_FD_SGA5.2 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; and cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618558.1
Plasmodium cf. vivax isolate KGggg1246_FD_SGA2.4 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; and cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618557.1
Plasmodium cf. vivax isolate KApts1680_FD_SGA5.3 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; and cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618556.1
Plasmodium cf. vivax isolate EKggg514_FD_SGA5.11 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; and cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618555.1
Plasmodium cf. vivax isolate EKggg1179_FD_SGA5.55 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; and cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618553.1
Plasmodium cf. vivax isolate EKggg1179_FD_SGA5.54 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; and cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618552.1
Plasmodium cf. vivax isolate EKggg1179_FD_SGA5.44 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; and cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618550.1
Plasmodium cf. vivax isolate EKggg1179_FD_SGA5.42 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; and cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial	34.2	34.2	100%	20	100%	KF618549.1

ANEXO J – ANÁLISE DOS *PRIMERS FORWARD/REVERSE* DE *P. vivax* NO PROGRAMA BLAST

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AATTGCACAAGAAAATGTAACT	23	53.94	26.09	6.00	4.00
Reverse primer	CAATGATAACATCTACT	17	41.60	29.41	6.00	1.00

Products on target templates

>[KY923424.1](#) Plasmodium vivax isolate 1089PNG mitochondrion, complete genome

```
product length = 311
Forward primer 1 AATTGCACAAGAAAATGTAACT 23
Template 3368 ..... 3390

Reverse primer 1 CAATGATAACATCTACT 17
Template 3678 ..... 3662
```

>[KY923423.1](#) Plasmodium vivax isolate 8006PNG mitochondrion, complete genome

```
product length = 311
Forward primer 1 AATTGCACAAGAAAATGTAACT 23
Template 3368 ..... 3390

Reverse primer 1 CAATGATAACATCTACT 17
Template 3678 ..... 3662
```

>[KY923422.1](#) Plasmodium vivax isolate 8007PNG mitochondrion, complete genome

```
product length = 311
Forward primer 1 AATTGCACAAGAAAATGTAACT 23
Template 3368 ..... 3390

Reverse primer 1 CAATGATAACATCTACT 17
Template 3678 ..... 3662
```

>[KY923421.1](#) Plasmodium vivax isolate 8012PNG mitochondrion, complete genome

```
product length = 311
Forward primer 1 AATTGCACAAGAAAATGTAACT 23
Template 3368 ..... 3390

Reverse primer 1 CAATGATAACATCTACT 17
Template 3678 ..... 3662
```

ANEXO K – ANÁLISE DO PRIMER FORWARD DE *P. malariae* NO PROGRAMA BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Plasmodium</i> sp. isolate TCptt19 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693451.1
<i>Plasmodium</i> sp. isolate MOpte51016 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; and cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693452.1
<i>Plasmodium</i> sp. isolate MSggg7212 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693446.1
<i>Plasmodium</i> sp. isolate MOpte51017 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693445.1
<i>Plasmodium</i> sp. isolate LBggg1222 cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome b (cytb) genes, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693444.1
<i>Plasmodium malariae</i> isolate ND-28 cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome b (cytb) genes, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693442.1
<i>Plasmodium malariae</i> isolate BI-3 cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome b (cytb) genes, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693441.1
<i>Plasmodium malariae</i> isolate BO-15 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693440.1
<i>Plasmodium malariae</i> isolate BO-13 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693439.1
<i>Plasmodium malariae</i> isolate BO-9 cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome b (cytb) genes, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693438.1
<i>Plasmodium malariae</i> isolate BO-6 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693436.1
<i>Plasmodium malariae</i> isolate BI-9 cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome b (cytb) genes, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693435.1
<i>Plasmodium malariae</i> isolate BI-4 cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome b (cytb) genes, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693433.1
<i>Plasmodium malariae</i> isolate Hu161 cytochrome oxidase subunit III (COIII) gene, partial cds; cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, complete cds; and cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693428.1
<i>Plasmodium malariae</i> isolate Hu153 cytochrome oxidase subunit III (COIII) gene, partial cds; cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, complete cds; and cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693427.1
<i>Plasmodium malariae</i> isolate Hu149 cytochrome oxidase subunit III (COIII) gene, partial cds; cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, complete cds; and cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693426.1
<i>Plasmodium malariae</i> isolate Hu115 cytochrome oxidase subunit III (COIII) and cytochrome b (cytb) genes, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693425.1
<i>Bos mutus</i> isolate yakQH1 chromosome 5	40.1	287	100%	0.30	100%	CP027073.1
<i>Plasmodium</i> cf. <i>malariae</i> isolate TL2pp3862_cytb_1.4 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	KY790535.1
<i>Plasmodium brasilianum</i> isolate 36-2015 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	KY709306.1
<i>Plasmodium brasilianum</i> isolate 32-2015 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	KY709305.1
<i>Plasmodium brasilianum</i> isolate 36-2014 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	KY709304.1
<i>Plasmodium brasilianum</i> isolate 32-2014 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	KY709303.1
<i>Plasmodium brasilianum</i> isolate 36-2013 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	KY709302.1
<i>Plasmodium brasilianum</i> isolate 34-2013 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	KY709301.1
<i>Plasmodium brasilianum</i> isolate 32-2013 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	KY709300.1
<i>Plasmodium brasilianum</i> isolate 89-2012 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	KY709299.1

ANEXO L – ANÁLISE DO PRIMER REVERSE DE *P. malariae* NO PROGRAMA BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Scophthalmus maximus chromosome 12	40.1	40.1	100%	0.30	100%	CP026254.1
Plasmodium sp. isolate TCptt19 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693451.1
Plasmodium sp. isolate MOpte51016 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; and cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693452.1
Plasmodium sp. isolate SYpte65 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693450.1
Plasmodium sp. isolate SYpte66 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693448.1
Plasmodium sp. isolate SYpte66 cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome b (cytb) genes, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693447.1
Plasmodium sp. isolate MSggg7212 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693446.1
Plasmodium sp. isolate MOpte51017 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693445.1
Plasmodium sp. isolate LBggg1222 cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome b (cytb) genes, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693444.1
Plasmodium malariae isolate ND-28 cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome b (cytb) genes, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693442.1
Plasmodium malariae isolate BI-3 cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome b (cytb) genes, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693441.1
Plasmodium malariae isolate BO-15 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693440.1
Plasmodium malariae isolate BO-13 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693439.1
Plasmodium malariae isolate BO-9 cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome b (cytb) genes, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693438.1
Plasmodium malariae isolate BO-6 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693436.1
Plasmodium malariae isolate BI-9 cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome b (cytb) genes, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693435.1
Plasmodium malariae isolate BI-4 cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome b (cytb) genes, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693433.1
Plasmodium malariae isolate Hu161 cytochrome oxidase subunit III (COIII) gene, partial cds; cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, complete cds; and cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693428.1
Plasmodium malariae isolate Hu153 cytochrome oxidase subunit III (COIII) gene, partial cds; cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, complete cds; and cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693427.1
Plasmodium malariae isolate Hu149 cytochrome oxidase subunit III (COIII) gene, partial cds; cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, complete cds; and cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693426.1
Plasmodium malariae isolate Hu115 cytochrome oxidase subunit III (COIII) and cytochrome b (cytb) genes, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	MF693425.1
Plasmodium brasilianum isolate 36-2015 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	KY709306.1
Plasmodium brasilianum isolate 32-2015 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	KY709305.1
Plasmodium brasilianum isolate 36-2014 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	KY709304.1
Plasmodium brasilianum isolate 32-2014 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	KY709303.1
Plasmodium brasilianum isolate 36-2013 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	KY709302.1
Plasmodium brasilianum isolate 34-2013 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	40.1	40.1	100%	0.30	100%	KY709301.1

ANEXO M – ANÁLISE DOS *PRIMERS FORWARD/REVERSE* DE *P. malariae* NO PROGRAMA BLAST

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGCATCACTTGATTTTTTC	20	50.21	30.00	4.00	0.00
Reverse primer	ACATAACCAAATAACAAGTG	20	49.17	30.00	2.00	2.00

Products on target templates

>[MF693451.1](#) Plasmodium sp. isolate TCptt19 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial

```
product length = 226
Forward primer 1 TGCATCACTTGATTTTTTC 20
Template 208 ..... 227
Reverse primer 1 ACATAACCAAATAACAAGTG 20
Template 433 ..... 414
```

>[MF693452.1](#) Plasmodium sp. isolate MOpte51016 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; and cytochrome b (cytb) gene, complete cds; mitochondrial

```
product length = 226
Forward primer 1 TGCATCACTTGATTTTTTC 20
Template 1301 ..... 1320
Reverse primer 1 ACATAACCAAATAACAAGTG 20
Template 1526 ..... 1507
```

>[MF693446.1](#) Plasmodium sp. isolate MSggg7212 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial

```
product length = 226
Forward primer 1 TGCATCACTTGATTTTTTC 20
Template 206 ..... 225
Reverse primer 1 ACATAACCAAATAACAAGTG 20
Template 431 ..... 412
```

>[MF693445.1](#) Plasmodium sp. isolate MOpte51017 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial

```
product length = 226
Forward primer 1 TGCATCACTTGATTTTTTC 20
Template 208 ..... 227
Reverse primer 1 ACATAACCAAATAACAAGTG 20
Template 433 ..... 414
```

>[MF693444.1](#) Plasmodium sp. isolate LBggg1222 cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome b (cytb) genes, partial cds; mitochondrial